



MASTERARBEIT

Frau B. Sc.

Christin Türke

Chromosomale Verlustanalyse in Fanc G, Fanc F und Fanc J aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs

Mittweida, 2012

MASTERARBEIT

Chromosomale Verlustanalyse in Fanc G, Fanc F und Fanc J aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs

Autor:

**Frau B. Sc.
Christin Türke**

Studiengang:

Molekularbiologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

MO10w1-M

Matrikelnummer:

20109

Hochschulbetreuer:

**Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde
(Hochschule Mittweida)**

Betrieblicher Betreuer:

**Dr. Gretel Wittenburg
(Zellkulturlabor, Klinik und Poliklinik
für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie,
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden)**

Zeitraum:

4. Fachsemester

Bibliografische Beschreibung:

Türke, Christin:

Chromosomale Verlustanalyse in Fanc G, Fanc F und Fanc J aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs. – 2012. – S. 14, S. 79, S. 20

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Masterarbeit, 2012

Referat:

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekularbiologische Untersuchung des *loss of heterozygosity* (LOH) in drei Tumorsuppressorgenen der Fanconi Anämie (Fanc G, Fanc F und Fanc J). Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Prüfung einer prognostischen Relevanz dieser Gene, um in Zukunft den Weg für die Entwicklung eines verbesserten kausalen Therapiekonzeptes für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle zu ebnen. Mit Hilfe einer Mikrosatellitenanalyse wird eine Multiplex-PCR zur Feststellung eines LOH etabliert. Die daraus resultierenden Amplifikate werden anschließend einer kapillarelektrophoretischen Fragmentanalyse unterzogen, sodass im Folgenden die für die LOH-Berechnung wichtigen Elektropherogramme ausgewertet werden können. Unter Verwendung von statistischen Analyseverfahren liefert ein LOH in den Genen Fanc G und Fanc F möglicherweise das Potential, als prognostischer Marker zu dienen. Auch der Ansatz der Verwendung der Mikrosatelliteninstabilität als prognostischen Marker könnte eine potentielle Relevanz besitzen. Weiterführende Analysen sind allerdings erforderlich.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich stets bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern, *Dr. Gretel Wittenburg* und *Dipl. Biol. Carola Petto*, die mir immer mit Rat und Tat beiseite standen und das Anfertigen dieser Arbeit mit Ihrem Fachwissen und ihren Erfahrungen erleichtert haben. Die stete Bereitschaft zu ideenreichen Diskussionen führte zum Erfolg dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei *Diana Jünger* bedanken, die mir durch ihre konstruktiven Ratschläge in experimentellen Fragen immer zur Verfügung stand. Mein Dank gilt auch *Oliver Kühn*, der mir durch seine Vorarbeiten zu diesem Thema neue Denkanstöße geben und meine Fragen stets beantworten konnte.

An dieser Stelle möchte ich *Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Günter Lauer* danken, der mir die Anfertigung dieser Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie erst ermöglicht hat. Besonderer Dank gilt *Dr. med. Dr. med. dent. Susanne Koy*, die dieses Thema ins Leben gerufen hat, und der *Praxis für Humangenetik*, die mir die experimentelle Durchführung der Analyse ermöglicht hat. Im Speziellen gilt dieser *Dr. Jens Plaschke*, der mir mit seinem Know-How beiseite stand und stets konstruktive Hinweise bezüglich der Auswertung der Daten geben konnte. Für die Betreuung seitens der Hochschule Mittweida möchte ich mich bei *Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde* bedanken.

Für die Schaffung einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor möchte ich mich bei *Dr. Gretel Wittenburg*, *Dipl. Biol. Carola Petto*, *Diana Jünger* und *Anne Nöldner* bedanken. Die langen Gespräche mit „Eisold“-Kuchen werden mir ewig im Gedächtnis bleiben.

Besonderer Dank gilt *Anne Nöldner*, die mir in kleineren Krisen immer zuhören und mich wieder aufmuntern konnte. Nicht all zuletzt möchte ich mich bei Ihr für die stete Diskussionsbereitschaft über mein Thema bedanken. Vor allem bin ich jedoch für die Freundschaft, das sehr angenehme WG-Leben, den Spaß und das abendliche Beisammensein dankbar. Des Weiteren wurde dieser Abschnitt meines Lebens mit viel Witz und Humor durch nahezu tägliche Skype-Konferenzen mit *Anne Nöldner* und *Carolin Poch* versüßt. Das Ende dieser Arbeit bedeutet nicht das Ende unseres Dreamteams!

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, *Volkmar Türke* und *Gabriele Türke*, sowie meiner ganzen Familie für die Unterstützung während des Studiums danken. Besonderer Dank gilt hierbei *Susann Türke*, meiner Zwillingsschwester, die mich in sehr langen Telefonaten immer wieder aufheitern und mir mit vielen Schach-Spielen eine Ablenkung bieten konnte. Auch wenn wir uns in dieser Zeit nicht oft gesehen haben, bleiben wir doch immer miteinander verbunden.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Motivation.....	1
1.2 Zielstellung	3
1.3 Gliederung der Arbeit	4
2 Biologische Grundlagen.....	5
2.1 Plattenepithelkarzinome	6
2.2 Kanzerogenese	10
2.3 Loss of Heterozygosity (LOH)	12
2.3.1 Mikrosatelliten als genetische Marker.....	13
2.3.2 Mikrosatelliteninstabilität.....	14
2.4 DNA-Reparatursystem und Fanconi Anämie	15
3 Material und Methoden	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	20
3.1.2 Geräte	21
3.1.3 Software.....	22
3.1.4 Stammlösungen und verwendete Puffer	22
3.2 Methoden	23
3.2.1 Mikrosatelliten.....	24
3.2.2 Patientenkollektiv und klinische Patientendaten	26
3.2.3 DNA-Extraktion	29
3.2.4 Polymerasekettenreaktion	30
3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese	31

3.2.6 Etablierung der Multiplex-PCR.....	32
3.2.7 Fragmentlängenanalyse	34
3.2.8 Auswertung	37
3.2.8.1 Berechnung des LOH.....	37
3.2.8.2 Homozygote Allelverteilung.....	39
3.2.8.3 Heterozygote Allelverteilung.....	39
3.2.8.4 Mikrosatelliteninstabilität	40
3.2.8.5 Statistische Auswertung.....	41
4 Ergebnisse	42
4.1 Primerinformationsgehalt	42
4.2 Analyse des Patientenkollektiv.....	44
4.3 Statistische Datenanalyse.....	47
4.3.1 Analyse der Patientendaten	47
4.3.2 Analyse der LOH-Daten.....	50
4.3.2.1 LOH-Analyse für Fanc G.....	51
4.3.2.2 LOH-Analyse für Fanc F	54
4.3.2.3 LOH-Analyse für Fanc J	57
4.3.3 Mikrosatelliteninstabilität.....	60
5 Diskussion.....	62
5.1 Chromosomale Region um Fanc G.....	65
5.2 Chromosomale Region um Fanc F	67
5.3 Chromosomale Region um Fanc J	70
5.4 Mikrosatelliteninstabilität	72
5.5 Aussagen zur prognostischen Relevanz.....	74
6 Zusammenfassung.....	76
7 Ausblick	79
8 Literaturverzeichnis	80
9 Anlagen	88
9.1 Anlage Teil 1 - klinische Patientendaten	I

9.2 Anlage Teil 2 - Gradienten-PCR	III
9.3 Anlage Teil 3 - statistische Datenanalyse	IV
9.3.1 Patientendaten	IV
9.3.2 LOH-Daten auf dem Chromosom 9	VI
9.3.3 LOH-Daten auf dem Chromosom 11	X
9.3.4 LOH-Daten auf dem Chromosom 17	XIV
9.3.5 Werte der LOH-Berechnung	XVII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen in Deutschland 2008.....	5
Abbildung 2	Mehrstufenprozess der Kanzerogenese.....	11
Abbildung 3	Two-Hit-Hypothese nach <i>Knudson</i>	12
Abbildung 4	Übersicht des FA/BRCA Pathway	17
Abbildung 5	Arbeitsschritte der LOH-Analyse	23
Abbildung 6	Lokalisation der Primer auf den drei Chromosomen	24
Abbildung 7	PCR-Programm für die Gradienten-PCR.....	33
Abbildung 8	PCR-Programm für die Multiplex-PCR.....	34
Abbildung 9	Aufbau eines kapillarelektrophoretischen Systems	36
Abbildung 10	LOH-Berechnung nach <i>Cawkwell et al.</i> und <i>Hahn et al.</i>	38
Abbildung 11	homozygote Allelverteilung bei der Mikrosatellitenanalyse	39
Abbildung 12	heterozygote Allelverteilung bei Mikrosatellitenanalyse.....	40
Abbildung 13	Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bei der Mikrosatellitenanalyse	41
Abbildung 14	Primerinformationsgehalt.....	43
Abbildung 15	Kaplan-Meier-Überlebenskurve beim Vergleich der Lymphknotenstadien	48
Abbildung 16	Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Patienten mit und ohne Resektion.....	49
Abbildung 17	Kaplan-Meier-Überlebenskurve beider Patientengruppen für Fanc G.....	52
Abbildung 18	Kaplan-Meier-Überlebenskurve beider Patientengruppen für Fanc F	56
Abbildung 19	Kaplan-Meier-Überlebenskurve beider Patientengruppen für Fanc J	59
Abbildung 20	Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patientengruppen mit und ohne MSI.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TNM-Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen	7
Tabelle 2	funktionelle Übersicht der 13 Fanconi-Anämie-Gene	16
Tabelle 3	Primer für die LOH-Analyse.....	25
Tabelle 4	Patientenkollektiv für die LOH Analyse.....	27
Tabelle 5	Pipettierschema der Gradienten-PCR.....	33
Tabelle 6	Etablierte, funktionsfähige Primerkombinationen für die Multiplex-PCR	34
Tabelle 7	Ergebnis der LOH-Analyse.....	44
Tabelle 8	Ergebnis des Allelverlusts bei Betrachtung der drei Genloci.....	46
Tabelle 9	Übersicht über die statistischen Auswertung für das Chromosom 9.....	53
Tabelle 10	Übersicht über die statistischen Auswertung für das Chromosom 11.....	57
Tabelle 11	Übersicht über die statistischen Auswertung für das Chromosom 17.....	59

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Deoxynucleotidetriphosphate
dsDNA	Double stranded DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOF	Elektroosmotic flux
EtBr	Ethidium bromide
FA	Fanconi anemia
Fanc	Fanconi anemia complementation group
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinomas
LOH	Loss of heterozygosity
MMR	Mismatch repair system
MSI	Microsatellite instability
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
NT	Normal tissue
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
ssDNA	Single stranded DNA
STR	Short tandem repeat
TNM	<u>T</u> umor <u>N</u> ode <u>M</u> etastasis
TT	Tumor tissue
UICC	Union internationale contre le cancer

1 Einleitung

1.1 Motivation

Orale Krebserkrankungen sind weltweit ein ernst zu nehmendes Problem. Vor allem in Südostasien, West- (Frankreich) bzw. Osteuropa (Ungarn, Slowakei, etc.) und Lateinamerika (Brasilien, Puerto Rico, Uruguay, etc.) sind diese bösartigen Neubildungen mit einer relativ hohen Inzidenzrate¹ vorzufinden [Warnakulasuriya, 2009]. Mit etwa 650.000 Neuerkrankungen pro Jahr zählen diese malignen Erkrankungen weltweit zu den sechs häufigsten Tumoren des Körpers [Jemal et al., 2011; Kademani, 2007]. Die Plattenepithelkarzinome stellen bei den bösartigen Neubildungen des Kopf- und Halsbereichs (engl. „*head and neck squamous cell carcinoma*“, kurz HNSCC) mit 90 % die häufigste Tumorentität dar [Parkin et al., 2005; Sadick et al., 2012]. Trotz der überaus großen Fortschritte in der Medizin in den letzten Jahrzehnten konnte die Prognose der Patienten im Erkrankungsfall nicht verbessert werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt immer noch nur 50 % [Forastiere et al., 2001].

Bekannt ist, dass die Ursache für die hohe Inzidenz von Tumoren des Kopf- und Hals-Bereichs in exogenen Faktoren liegt. Vor allem ein exzessiver Alkohol- und/oder Nikotinkonsum induziert beispielsweise chronische Mundschleimhauterkrankungen, die letztendlich zu Präkanzerosen² für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen führen [Ragin et al., 2007]. Eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) spielt ebenfalls bei der Pathogenese in 25 % aller HNSCC eine wichtige Rolle [Gillison et al., 2000; Joseph & D'Souza, 2012; Mork et al., 2001; van Houten et al., 2001]. Endogene Risikofaktoren, wie etwa genetische Dispositionen, können zusätzlich zur Tumorentstehung beitragen [Sadick et al., 2012]. In diesem Zusammenhang sind spezifische Gene besonders interessant, die an der Entstehung und/oder Progression maligner Neubildungen beteiligt sein könnten. Das Tumorsuppressorgen p53 beispielsweise geriet in den letzten Jahrzehnten in den Mittelpunkt der Forschung, weil es in vielen Krebserkrankungen mutiert vorliegt [Whibley et al., 2009]. Mutationen im Tumorsuppressorgen BRCA1 und BRCA2 sind mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Ausbildung eines Mamma- bzw. Ovarialkarzinom assoziiert [Futreal et al., 1994; Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995]. In Bezug auf HNSCC sind noch keine derartigen prädiktiven genetischen Mutationen bekannt. Daher öffnet neues Wissen über genetische Dispositionen innovative Wege bezüglich der frühen Diagnostik, neuartigen Therapien oder der Prognose von HNSCC.

¹ relative Größe über die Anzahl der Neuerkrankungen

² Gewebeveränderung mit erhöhtem Risiko zur malignen Entartung

Die Untersuchung von genetischen Markern im menschlichen Genom, die an der Entstehung und/oder der Progression der Plattenepithelkarzinome in der Mundhöhle beteiligt sein könnten, stellt einen wichtigen Schritt für die genaue genetische Definition der Tumorerkrankung dar. In diesem Zusammenhang sind die Fanconi-Anämie-Gene als Tumorsuppressorgene besonders interessant. Sie dienen der Überwachung der ordnungsgemäßen DNA-Replikation und der Reparatur etwaiger DNA-Replikationsfehler. Genetische Defekte in den Fanc-Genen können zum Ausfall dieser Funktion führen und folgendermaßen zur Vermehrung entarteter Zellen. Patienten mit einer Fanconi Anämie besitzen ein 500-700 fach erhöhtes Risiko an Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs zu erkranken als vergleichbare gesunde Patienten [Kutler et al., 2003a; Kutler et al., 2003b; Rosenberg et al., 2003]. Möglicherweise wird die Forschung auf diesem Gebiet zukünftig neuartige Detektionsmöglichkeiten im Bereich der genetischen Diagnostik hervorbringen und die genauere Eingrenzung der Prognose erlauben.

1.2 Zielstellung

Die Überlebensraten bei neoplastischen Erkrankungen des Kopf- und Halsbereichs sind mit unter 50 % relativ schlecht [Forastiere et al., 2001]. Für die Entwicklung eines verbesserten kausalen Therapiekonzepts sind Kenntnisse über die Genetik der Krebsentstehung notwendig. Diese führen möglicherweise zur Steigerung der Überlebensraten und der damit verbundenen verbesserten Prognose. Ziel dieser Arbeit ist es, eine Auswahl von Plattenepithelkarzinomen aus der Mundhöhle retrospektiv genauer hinsichtlich der Existenz etwaiger genetischer Dispositionen in drei Fanc-Genen (Fanc G, Fanc F und Fanc J) zu untersuchen. Diese drei Gene können in tumorös entarteten Geweben anders reguliert sein als in dem entsprechenden Normalgewebe und könnten daher als potentielle genetische Marker in Frage kommen. Insbesondere die molekulargenetische Bestimmung des *loss of heterozygosity* (LOH) soll vorhandene genetische Veränderungen und den damit verbundenen möglichen Funktionsausfall der zu untersuchenden Fanconi-Tumorsuppressorgene aufspüren. Die LOH-Analyse ermöglicht die Erforschung des Verlusts von genetischem Material (DNA) im Tumorgewebe im Vergleich zu dessen Normalgewebe mit Hilfe von polymorphen Markern. In Zusammenhang mit klinischen Parametern, wie Patientenalter bei Erkrankung, Geschlecht, Tumor-Stadium, Alkohol- und Nikotinabusus und das Auftreten eines Rezidivs, wird die Auswertung durchgeführt werden. Durch eine Überlebenszeitanalyse kann eventuell die Überlebenszeit der Patienten mit dem Auftreten dieser genetischen Disposition assoziiert werden. Idealerweise ist eine bestimmte prognostische Aussage anhand der genetischen Disposition für Patienten mit einer Plattenepithelkarzinomentwicklung in der Mundhöhle möglich. Sofern eines der drei untersuchten Fanc-Gene als möglicher Prognosefaktor verwendet werden kann, kann die hier durchgeführte Analyse als Grundlage für die Entwicklung eines zukünftigen kausalen Therapiekonzepts genutzt werden. Die molekulargenetischen Untersuchungen an dieser Art von Tumorerkrankungen führen möglicherweise zur verbesserten therapeutischen Intervention und zu neuen Ansätzen in der frühen Diagnostik.

1.3 Gliederung der Arbeit

Die biologischen Grundlagen für das Verständnis dieser Arbeit werden in *Kapitel 2* dargelegt. Hierbei wird eine Verbindung zwischen der Epidemiologie und der Ätiologie von Plattenepithelkarzinomen (*Kapitel 2.1*) hergestellt und Bezug auf die Kanzerogenese als Mehrstufenprozess (*Kapitel 2.2*) genommen. Anschließend erfolgt eine detaillierte Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten molekulargenetischen Analyse des *loss of heterozygosity* (LOH) sowie der damit in Verbindung stehenden Mikrosatelliten als polymorphe Marker in *Kapitel 2.3*. Da in dieser Arbeit die genetische Disposition in Fanconi-Anämie-Genen untersucht wird, erläutert *Kapitel 2.4* deren Funktionsweise im DNA-Reparaturmechanismus näher. Nebenher wird ein Überblick über den Stand der aktuellen Forschung gegeben, wobei im Speziellen auf die drei verwendeten Fanc-Gene Fanc G, Fanc F und Fanc J eingegangen wird. Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden werden in *Kapitel 3* erörtert. Nach einem schematischen Überblick über die Versuchsdurchführung (Abbildung 5), werden die verwendeten Mikrosatellitenmarker mit genauer Definition deren Position in der Nähe der zu untersuchenden Genloci (*Kapitel 3.2.1*) vorgestellt. Anschließend folgt die Beschreibung, nach welchen Kriterien das Patientenkollektiv ausgewählt wird und welche klinischen Patientendaten in Zusammenarbeit mit dem *Klinischen Krebsregister Dresden* ausgewählt werden (*Kapitel 3.2.2*). Nach Heraussuchen aller Blutproben und Karzinomgewebe aus der Tumorbank der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Uniklinikum Dresdens, musste die DNA extrahiert werden. Die Versuchsbeschreibung befindet sich in *Kapitel 3.2.3*. Um den Aufwand der Vervielfältigung der DNA zu minimieren und den Einsatz des kostbaren Karzinomgewebe so gering wie möglich zu halten, wird in *Kapitel 3.2.4* zunächst die Polymerasekettenreaktion (PCR) und in *Kapitel 3.2.6* die dazu etablierte Multiplex-PCR beschrieben. Die daraus entstehenden PCR-Amplifikate werden in der unter *Kapitel 3.2.7* beschriebenen Fragmentanalyse kapillarelektrophoretisch analysiert. Abschließend wird die Auswertung der durch die Kapillarelektrophorese gewonnenen Elektropherogramme in *Kapitel 3.2.8* vorgestellt. Neben der statistischen Auswertung werden hierzu die Berechnung des LOH sowie die heterozygoten und homozygoten Fälle bei der Allelverteilung dargelegt. Die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung des LOH werden in *Kapitel 4* vorgestellt und anschließend in *Kapitel 5* diskutiert. In Hinblick auf die prognostische Relevanz zeigt sich bei Fanc G und Fanc F interessanterweise das Potential einer genaueren Definition der Überlebenszeit anhand der analysierten genetischen Disposition. Eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse befindet sich in *Kapitel 6*. Mit einem Ausblick (*Kapitel 7*) über die weiteren Schritte auf dem Weg zur Entwicklung eines kausalen Therapiekonzepts für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle wird die Arbeit abgerundet.

2 Biologische Grundlagen

Laut einer Schätzung des *Robert Koch Instituts* erkrankten in Deutschland 2008 ca. 246.700 Männer und 223.100 Frauen an Krebs neu. Im selben Jahr starben etwa 216.000 Menschen der deutschen Bevölkerung. Der prozentuale Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen ist geschlechterspezifisch unterschiedlich. So sind bei Männern Krebserkrankungen in der Prostata, dem Darm oder der Lunge am häufigsten; bei Frauen werden vorwiegend Tumore in den Brustdrüsen, dem Darm, der Lunge und des Gebärmutterkörpers ausgebildet. Ein deutlicher geschlechterspezifischer Unterschied wird erst in den weniger häufig vorkommenden Krebserkrankungen sichtbar (Abbildung 1). [Robert Koch Institut, 2012]

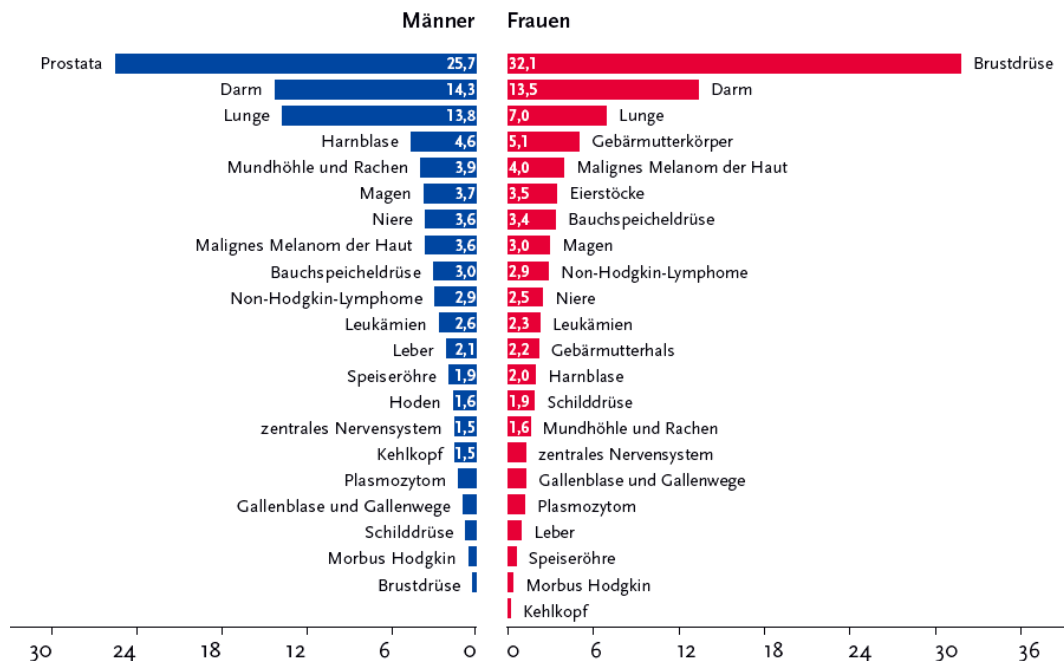


Abbildung 1 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen in Deutschland 2008

Der prozentuale Anteil der Tumorlokalisationen an allen Neuerkrankungen im Jahr 2008 ist geschlechterspezifisch unterschiedlich. Aus der Abbildung sind die einzelnen Häufigkeiten zu entnehmen. Der Anteil der männlichen Erkrankten mit 246.700 ist etwas höher als der der weiblichen Erkrankten mit 223.100. [Robert Koch Institut, 2012]

Im Folgenden werden die biologischen Grundlagen näher erläutert, die zum Verständnis dieser Arbeit beitragen sollen. Besonderes Interesse gilt hierbei der Plattenepithelkarzinomentstehung, dem *loss of heterozygosity* (LOH) und der Erläuterung des DNA-Reparatursystems.

2.1 Plattenepithelkarzinome

Laut dem *Robert Koch Institut* erkrankten in der Bundesrepublik Deutschland 2012 etwa 13.000 Menschen (9.520 Männer und 3.490 Frauen) an einem Tumor im Bereich der Mundhöhle und des Rachens. Etwa 3.776 Männer und 1.170 Frauen starben 2008 in Deutschland an diesen Karzinomen [Robert Koch Institut, 2012]. Häufige Lokalisationsstellen sind vor allem die Unterlippe (78 %), die Zunge (22 %), der Mundboden (17 %), die Gingiva (6 %) und der Gaumen (5,5 %) [Siewert, 2006]. Weltweit variieren die Mundhöhlenkarzinomerkrankungen je nach Kultur und geografischer Region. So ist die höchste Inzidenzrate bei Männern in Frankreich und bei Frauen in Indien vorzufinden. Während die Inzidenzraten einen rückläufigen Trend bei beiden Geschlechtern in Indien, Hongkong, Brasilien und USA (weiße Bevölkerung) zeigen, ist eine zunehmende Tendenz in vielen anderen Bevölkerungsgruppen zu beobachten, vor allem in Zentral- und Osteuropa, Skandinavien, Kanada, Japan und Australien [Sankaranarayanan et al., 1998]. Die 5-Jahres-Überlebensrate zeigt bei Frauen mit 59 % im Vergleich zu Männern mit 44 % eine etwas günstigere Entwicklung [Robert Koch Institut, 2012]. Insgesamt schwankt sie je nach Lokalisation und dem klinischen Ausmaß der Erkrankung zwischen 20 % und 90 % [Sankaranarayanan et al., 1998]. Prinzipiell ist die Überlebensrate deutlich günstiger, je früher das Karzinom diagnostiziert wird. Laut dem *Robert Koch Institut* sind Männer nicht nur drei Mal häufiger, sondern auch im Mittel mit 61 Jahren fünf Jahre früher als Frauen betroffen. Alles in allem treten die Karzinome in der Mundhöhlenregion oft in der vierten Lebensdekade auf [Robert Koch Institut, 2012].

Das Klassifikationssystem der Mundhöhlenkarzinome erfolgt über das TNM-System. Dieses ist für die Festlegung des UICC-Krankheitsstadiums sowie für die Einschätzung der Ausbreitung eines bösartigen Tumors im Körper des Patienten wichtig. Das „T“ kennzeichnet die Expansion des Primärtumors (engl. *tumor*) mit Ort und Größe. Die beiden anderen Buchstaben „N“ und „M“ beschreiben das Vorhandensein oder das Fehlen von entweder benachbarten Lymphknotenmetastasen (engl. *node*) oder Fernmetastasen (engl. *metastases*). Tabelle 1 stellt das TNM-Klassifikationssystem in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad und der UICC-Stadieneinteilung übersichtlich dar.

Histologisch betrachtet, sind Mundhöhlenkarzinome solide Tumore, von denen etwa 90 % zum Typ des Plattenepithelkarzinoms gehören [Riechelmann, 2001; Siewert, 2006]. Der Differenzierungsgrad ist oft mäßig bis sehr gut differenziert (G2). Die häufigste Erstbehandlung bei Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms stellt die Resektion dar, wenngleich auch kleinere Tumore einer ausschließlichen Radiotherapie unterzogen werden können. Ab einer bestimmten

Tumorgroße wird oft eine vollständige „Neck-Dissection“³ durchgeführt, bei der nicht nur der Tumor, sondern auch die Lymphgefäße des Halsbereichs entfernt werden. Etwa 15 % aller Patienten können laut dem DÖSAK⁴ bei der Erstbehandlung nicht operiert werden. Hier erfolgt eine Behandlungskombination aus Radio- und Chemotherapie. Allerdings ist bei diesen Patienten die 5-Jahres-Überlebensrate mit etwa 20 % deutlich geringer als bei Patienten, die eine radikale Resektion erhalten haben. [Howaldt et al., 2000; Siewert, 2006]

Tabelle 1 TNM-Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen

Die Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen erfolgt oft durch eine posttherapeutisch histopathologische Klassifikation (pTNM). Diese liefert den gesicherten Befund und wird nach den gleichen Kategorien angegeben, wie in der Tabelle dargestellt. [Siewert, 2001; Siewert, 2006]

Primärtumor	
TX	Primärtumor nicht zu beurteilen
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumordurchmesser < 2 cm
T2	Tumordurchmesser 2 - 4 cm
T3	Tumordurchmesser > 4 cm
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen (z.B. Knochen)
Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht zu beurteilen
N0	Kein Hinweis auf regionäre Lymphknoten
N1	Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten bis 3 cm Durchmesser auf der Tumorseite
N2	Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten zwischen 3 cm und 6 cm Durchmesser auf der Tumorseite
N3	Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten bis 6 cm Durchmesser auf der entgegengesetzten Tumorseite
Fernmetastasen	
MX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
Differenzierungsgrad	
G1	Hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinome
G2	Mäßig bis gut differenzierte Plattenepithelkarzinome
G3/G4	Schlecht differenzierte Plattenepithelkarzinome

³ Radikale Halslymphknotenausräumung

⁴ Deutsch - Österreichisch - Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich

UICC-Stadium			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
Stadium IV	T1, T2, T3, T4	N2, N3	M0
	T1, T2, T3, T4	N0, N1, N2, N3	M1

Die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen steht oft in Verbindung mit exogenen Faktoren. Bekannte Risikofaktoren sind vor allem Tabakkonsum und übermäßiger Alkoholkonsum. Das Zusammenwirken beider kanzerogenen Noxen⁵ bewirkt ein mehr als 30-faches Risiko [American Cancer Society, 2008]. Eine getrennte Konsumierung erhöht das Erkrankungsrisiko beim Tabakkonsum um das 5-fache, beim Alkoholkonsum um das 10-fache [Siewert, 2006]. Dass ein übermäßiger Alkoholkonsum in Verbindung mit dem pathogenen Mechanismus der Krebsentstehung steht, kann in der Literatur nicht vollständig bestätigt werden, da Ethanol als nicht kanzerogen eingestuft wurde. Doch gibt es einige Hypothesen, das Alkohol als Risikofaktor für Mundhöhlenkarzinome zu deuten ist, wenn eine orale oder systematische Konsumierung erfolgt. So kann Ethanol beispielsweise die in der oralen Mundschleimhaut vorhandenen Lipide lösen, wodurch Angriffspunkte für andere kanzerogene Noxen geschaffen werden [Figuero Ruiz et al., 2004]. Auch der Alkoholgehalt kann die Tumorentstehung begünstigen; *Castellsagué et al.* beschrieb, dass sich das Erkrankungsrisiko mit steigendem Alkoholgehalt signifikant erhöht [Castellsagué et al., 2004]. Eine schlechte Mundhygiene, der geringe Verzehr von Obst und Gemüse oder eine mechanische Irritation, beispielsweise durch einen schlecht sitzenden Zahnersatz oder abgebrochene Zähne, können ebenfalls das Erkrankungsrisiko für Mundhöhlenkarzinome steigern [Riechelmann, 2001; Robert Koch Institut, 2012]. Auch berufsbedingter Kontakt mit spezifischen Schadstoffen, wie etwa Lösungsmittel oder Farben, können das Risiko erhöhen [Riechelmann, 2001]. Neue Studien zeigen, dass *humane Papillomaviren* (HPV) auch mit der Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen assoziiert werden können. Eine Infektion mit HPV spielt bei der Pathogenese in 25 % aller HNSCC eine wichtige Rolle [Gillison et al., 2000; Joseph & D'Souza, 2012; Mork et al., 2001; van Houten et al., 2001]. So lieferte die Studie von *Cruz et al.* signifikante Ergebnisse zu einer HPV-Positivität des Typs 16 in erkrankten Gingivaschleimhäuten. Als Kontrolle wurde gesunde Mundschleimhaut verwendet, die keinerlei Anzeichen für einen HPV-Befall lieferte. Darüber hinaus wurde ein signifikanter

⁵ Kanzerogene Noxen sind Stoffe, die eine krebserzeugende Wirkung auf ein Organ oder Organismus ausüben.

Zusammenhang zwischen der HPV-Präsenz und dem Alter gefunden; Patienten oberhalb des 60. Lebensjahres zeigten eine geringe Prävalenz im Vergleich zu Patienten unterhalb dieses Alters [Cruz et al., 1996; Ringström et al., 2002]. Die erhöhte Inzidenz des Mundhöhlenkarzinoms in vereinzelt geographischen Regionen lässt sich auf den landestypischen Konsum bestimmter Genusswaren zurückführen, wie zum Beispiel das Kauen von Betelnüssen, Zigaretten, das „Bidi-Rauchen“ (indische zigarettenähnliche Tabakware) oder dem hochprozentigen Alkoholkonsum [Sankaranarayanan et al., 1998].

2.2 Kanzerogenese

„Krebs ist eine Erkrankung der zellulären Signalmechanismen, die von genetischen Veränderungen ausgeht“ [Schulte-Hermann & Parzefall, 2010, S. 182]. Im Allgemeinen liegt dem Mechanismus der Krebsentstehung die Umwandlung einer Normalzelle in eine entartete Tumorzelle zugrunde. Es werden dabei maligne (bösartige) und benigne (gutartige) Geschwulste unterschieden. Maligne Tumore werden in der Literatur auch als *Neoplasie* bezeichnet. Man unterscheidet hierbei Karzinome (epithelialer Ursprung) und Sarkome (mesodermaler Ursprung). Benigne Geschwulste bilden zwar Gewebswucherungen, allerdings erfolgt kein Durchbruch der basalen Membran, sodass keine benachbarten Gefäße oder Gewebe infiltriert werden. Mit wenigen Ausnahmen sind die gutartigen Geschwulste durch ein langsames Wachstum und ihre geringe Vaskularisierung gekennzeichnet [Schimming, 2002]. Die Streuungsfähigkeit ist weitestgehend begrenzt. Maligne Tumore hingegen können die Basalmembran durchbrechen und benachbartes Bindegewebe invadieren. So finden die Tumorzellen Anschluss an das Lymph- und Blutsystem, sodass es schnell zur Ausbildung von Fernmetastasen in anderen Organen kommen kann. Neoplastische Gewebe sind vor allem durch eine hohe Gefäßdichte und durch ihre schnelle Proliferation charakterisiert [Schimming, 2002]. [Wagener & Müller, 1996]

Allgemein entsteht Krebs, wenn eine zuvor gesunde Zelle durch mehrere Mutationen in der DNA beschädigt wird. Bei diesen Mutationen handelt sich oft um Punktmutationen, Insertionen, Deletionen, Amplifikationen oder Translokationen. Die DNA-Schädigungsphase wird auch als **Initialphase** im Prozess der Kanzerogenese (Abbildung 2) bezeichnet. Spezifische DNA-Reparaturmechanismen oder das Einleiten des programmierten Zelltods, die Apoptose, beheben in der Regel diese Mutationen. Allerdings können auch diese Mechanismen versagen. Zwischen der Initialphase und dem tatsächlichen Ausbruch der Krebserkrankung können ca. 5 bis 30 Jahre liegen. Die Dauer wird als Latenzphase bezeichnet. Anschließend folgt die **Promotion**, in der die Mutationen auf die Tochterzellen vererbt werden. Es folgt die Bildung eines präneoplastischen Zellklons, der zunächst ein benignes Verhalten zeigt. Die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung, der maligne Phänotyp, wird durch weitere Mutationen in der DNA erworben. Dieser Prozess wird auch als **Progression** bezeichnet, der letztendlich zur Ausbildung der Neoplasie führt. [Krieger, 2011; Schulte-Hermann & Parzefall, 2010; Wagener & Müller, 1996]

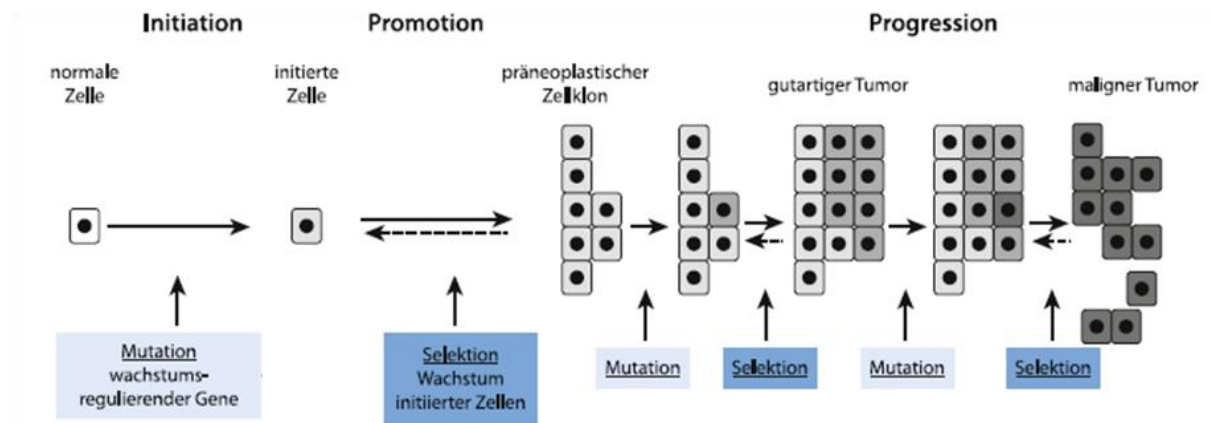


Abbildung 2 Mehrstufenprozess der Kanzerogenese

Die Tumorentstehung erfolgt in vier Schritten: 1. In der Initiationsphase erfolgt die DNA-Schädigung durch verschiedene endogene und exogene Einflussfaktoren. Eine initiierte Zelle entsteht; 2. In der Promotionsphase entsteht ein Zellklon aus der initiierten Zelle; 3. Mutationen verändern den präneoplastischen Zellklon hinsichtlich seiner genetischen Struktur. Es folgt die Bildung eines benignen Tumors; 4. Mutationen wirken auf den benignen Tumor ein, sodass anschließend ein malignes Verhalten des Tumors beobachtet wird. Der 3. und 4. Schritt zählt zur Progressionsphase. Die Initiations- und die Progressionsphase sind irreversible Phasen, während hingegen die Promotionsphase prinzipiell reversible Vorgänge darstellen. [Schulte-Hermann & Parzefall, 2010]

Es gibt vier verschiedene Arten von Kanzerogenen⁶ (chemische, physikalische, genetische sowie virale), die eine Schädigung in der Erbinformation einer gesunden Zelle hervorrufen können. Besonders interessant sind Mutationen in drei Gengruppen, die für die Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung verantwortlich sind. „*Onkogene* sind Gene, die die Fähigkeit besitzen, unter bestimmten Voraussetzungen mittels ihrer Genprodukte (Proteine) eine primäre nicht tumorigen veränderte Zelle in eine tumorigene Zelle umzuwandeln“ [Wrba, 2001; S. 62]. Die inaktive Form eines Onkogens wird als Protoonkogen bezeichnet, welches eine physiologische Funktion in der Zelle ausübt. Für das pathologische Verhalten einer Zelle müssen also Onkogene aktiviert werden. Eine weitere Gengruppe sind die *Mutatorgene*. „Sie haben eine übergeordnete Funktion für die Erhaltung der Integrität bzw. für ein geordnetes Zusammenspiel des Genoms“ [Buselmaier & Tariverdian, 2005; S. 314]. Mutationen in Mutatorgenen steigern die spontane Mutationsrate um das 100-1000 fache und werden, wie Tumorsuppressorgene, rezessiv vererbt. Mutationen in *Tumorsuppressorgenen* führen zur Inaktivierung der für die Hemmung der Zellproliferation wichtigen Genprodukte. Solch ein Gen unterliegt einem Funktionsverlust, wenn beide Allele auf diesem Genbereich inaktiviert worden sind (rezessiv). Für den Funktionsnachweis von Tumorsuppressorgenen ist der *Loss of Heterozygosity* im Tumorgewebe wichtig, auf den im folgenden Kapitel näher eingegangen wird. [Buselmaier & Tariverdian, 2005; Graw, 2010]

⁶ Krebserregende Verbindungen

2.3 Loss of Heterozygosity (LOH)

Jeder Mensch weist in somatischen Zellen einen diploiden Chromosomensatz auf bestehend aus einem mütterlichen und einem väterlichen Chromosom. Auf den diploiden Chromosomen befinden sich zwei nahezu identische Kopien der verschiedenen Genloci. Mutationen innerhalb eines betrachteten Genlocus führen zur Ausbildung der sogenannten Heterozygotie. Das bedeutet, es entstehen Allele mit unterschiedlichen Basensequenzen. Allele sind somit definiert als unterschiedliche Zustandsformen eines Gens, die sich am gleichen Genort der homologen Chromosomen befinden [Murken et al., 2006, S. 13]. Jeder Mensch kann aufgrund seines diploiden Chromosomensatzes nur zwei Allele eines bestimmten Gens ausbilden. Sind die Allele identisch, so ist er bezüglich des betrachteten Gens homozygot. Unterscheiden sich die Allele voneinander, wird er als heterozygot in Bezug auf das betrachtete Gen bezeichnet. [Murken et al., 2006]

In den 1970er Jahren beschrieb *Knudson* die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen am Beispiel der Retinoblastomentwicklung [Knudson, 1971]. Er stellte die *Two-Hit-Hypothese* auf, in der zwei genetische Mutationsereignisse zur Ausbildung einer malignen Tumorentwicklung führen (Abbildung 3).

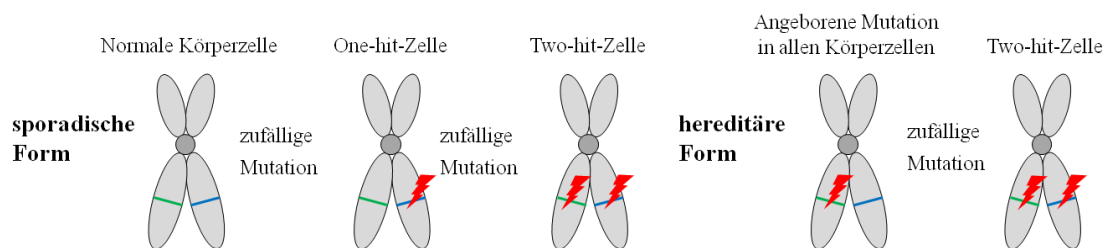


Abbildung 3 Two-Hit-Hypothese nach Knudson

Es gibt die hereditäre (erbliche) und die sporadische (nicht-erbliche) Form. Ist die erste Mutation des ersten Allels somatischen Ursprungs, entsteht die sogenannte One-hit-Zelle. Bei einer Keimbahnmutation (hereditäre Form), ist der „One-hit“ bereits vererbt worden. Es besteht eine genetische Prädisposition. Aufgrund des dominanten gesunden Allels kann das Gen immer noch richtig exprimiert werden. Wenn eine zweite zufällige Mutation somatischen Ursprungs das zweite Allel des gleichen Genlocus zerstört (Two-hit-Zelle), kann das Gen nicht mehr ordnungsgemäß exprimiert werden und es folgt eine Ausbildung von tumorösen Gewebe aufgrund genomischer Instabilitäten. Die häufigste Form für einen zweiten Hit entsteht durch den Verlust der Heterozygotie. [Knudson, 1971]

Es gibt die hereditäre Form, in welcher der erste „Hit“ bereits genetisch vererbt worden ist, und die sporadische Form, in welcher der erste Hit durch eine somatische Mutation erfolgt. Der zweite „Hit“ ist immer somatischen Ursprungs. Die hereditäre Form manifestiert sich in einem deutlich früheren Lebensalter als die sporadische Form. Der Patient besitzt bereits bei der Geburt eine genetische Prädisposition. Die Inaktivierung beider Allele eines Genlocus in Tumorsuppressorgenen, eine sogenannte biallelische Mutation, führt zu einem vollständigen Funktionsverlust („loss of function“) und letztendlich zur Ausbildung von neoplastischem

Gewebe. Eine monallelische Mutation erhöht lediglich das Risiko für die Ausbildung eines Karzinoms. *Knudson* lieferte so das erste Indiz für das rezessive Verhalten von Tumorsuppressorgen. [Knudson, 1971; Murken et al., 2006, Schaaf & Zschocke, 2008; Thiagalingam et al., 2002]

Der zweite „Hit“ erfolgt in den meisten Fällen durch den Verlust der Heterozygotie (engl. *Loss of Heterozygosity*, kurz: LOH). Der LOH ist eine genetische Alteration, die in vielen Neoplasien auftritt. Regionen, deren LOH nicht zufällig ist, können auf die Präsenz von Genen hinweisen, deren Verlust die Tumورprogression fördert und so eine prognostische Signifikanz haben [Paulson et al., 1999]. Der Verlust von genetischem Material kann mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorgen assoziiert sein. So wird die Detektion des LOH auf einem chromosomalen Locus als der kritische Nachweis von Tumorsuppressorgen angesehen [Beder et al., 2003]. Ein LOH auf dem zweiten Allel kann durch unterschiedliche Mechanismen ausgebildet werden. So spielen beispielsweise eine einfache Deletion oder Insertion, Doppelstrangbrüche oder mitotische Rekombinationsereignisse eine wichtige Rolle. Ebenso gut können vollständige Chromosomenarme oder Teile davon verloren gehen, z.B. als Resultat einer Translokation. Auch ein vollständiger Chromosomenverlust durch „*nondisjunction*“ Defekte im Chromosom ist denkbar. [Thiagalingam et al., 2002]

Im Folgenden werden in zwei Unterpunkten die Bedeutung der Mikrosatelliten als genetische Marker bei einer Allelverlustanalyse und die Rolle der Mikrosatelliteninstabilität näher erläutert.

2.3.1 Mikrosatelliten als genetische Marker

Neben den Transposons und den Retroposons erzeugt die repetitive DNA kurze, sich mehrfach hintereinander wiederholende Sequenzmotive innerhalb eines Genoms. Makro-, Mini- und Mikrosatelliten bilden die drei Untergruppen möglicher repetitiver Sequenzabschnitte. Mikrosatelliten, auch als *Short tandem repeats* (STR) bezeichnet, machen ca. 0,5 % des menschlichen Genoms aus und sind kleine Anordnungen von Tandemwiederholungseinheiten, die über das gesamte Genom verteilt sind. Mikrosatelliten sind vor allem in Abschnitten zwischen den Genen oder in den Introns innerhalb eines Gens aufzufinden. Sehr selten treten sie in codierten Sequenzen auf. Es werden bevorzugt STRs von Mono-, Di-, Tri- und Tetranukleotidwiederholungseinheiten verwendet. Die Anzahl der STRs ändert sich im Verlauf der Zellproliferationen, wodurch Polymorphismen entstehen. Die natürlich vorkommenden Polymorphismen innerhalb der Mikrosatelliten werden auch als Marker bezeichnet. Die gleichmäßige Verteilung über das gesamte Genom und die hohe Heterozygotiefrequenz dieser Marker stellen zwei wichtige Eigenschaften dar. Letzteres ist für die spezifische genetische

Aussagekraft wichtig. Jeder Mensch weist eine unterschiedliche Repeatlänge dieser Marker auf, sodass die STRs als Grundlage für Genanalysen dienen können; im Speziellen bilden STRs die Basis für den individuellen genetischen Fingerabdruck. [Chichon et al., 2002; Murken et al., 2006; Strachan, 1994]

Mit Hilfe der polymorphen Mikrosatelliten können bei einer LOH-Analyse Genloci von Tumorsuppressorgen nachgewiesen werden. Der Abstand des zu untersuchenden Genlocus und des Mikrosatellitenmarkers kann bis zu 1 Million Basenpaare betragen, um den genetischen Verlust eines Allels detektieren zu können [Timpert, 2003]. Es wird tumoröses und gesundes Gewebe des gleichen Patienten benötigt. Die Detektion eines LOH kann über verschiedene Verfahren erfolgen, wie etwa die Kapillarelektrophorese oder über ein Polyacrylamidgel.

2.3.2 Mikrosatelliteninstabilität

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) resultiert aus dem Funktionsverlust des DNA-Mismatch-Reparatursystems und gibt genetische Instabilitäten an [Boland et al, 1998]. Besonders in Genombereichen mit repetitive Sequenzen (Mikrosatelliten) treten Fehler während der DNA-Replikation auf, meist in Form von einzelnen Basenfehlpaarungen („mismatches“). Diese äußern sich in Verlängerungen oder Verkürzungen der Mikrosatellitensequenz [Zuo et al., 2009]. Im Normalfall werden diese Fehler erkannt und durch das Mismatchreparatursystem behoben. Durch Deletionen, Insertionen oder transkriptionale Inaktivierungen können diese Systeme ihre Funktion verlieren. Folglich reichern sich in den Mikrosatelliten vermehrt Mutationen an. Zeigen mindestens zwei Marker eine Instabilität im neoplastischen Gewebe, werden die Tumore als MSI-H (MSI-*high*) bezeichnet; ist nur ein Marker betroffen, handelt es sich um MSI-L (MSI-*low*). Wird keine MSI detektiert, wird das Tumorgewebe als MSS (Mikrosatelliten-Stabil) bezeichnet [Dietmaier, 2010]. [Ganten et al., 2002]

2.4 DNA-Reparatursystem und Fanconi Anämie

Die Mutationsrate des menschlichen Genoms schwankt in unterschiedlichen Geweben und in verschiedenen Genen innerhalb einer Zelle. Beim Menschen kann ein Durchschnittswert von etwa 1 Basenveränderung pro 10^{10} Nukleotiden angenommen werden [Ganten & Ruckpaul, 2007]. Am häufigsten entstehen aber DNA-Schäden durch Depurinierung⁷ oder Desaminierung⁸. So finden jeden Tag etwa 5.000 - 10.000 solcher Depurinierungen und 1.000 derartige Desaminierungen statt [Singer & Berg, 1992]. Zelluläre Mechanismen sind für die Abwehr dieser DNA-Mutationen verantwortlich. Dazu zählen Kontrollmechanismen für die DNA-Synthese sowie Zellzykluskontrollpunkte mit Entscheidungsmöglichkeiten für Apoptose und DNA-Reparatursysteme [Vohr, 2012]. Im menschlichen Körper gibt es mehrere solcher Reparaturmechanismen: **1. Direkte Schadensreversion:** eine fehlerhafte Methylgruppe an einer Base wird enzymatisch korrigiert; **2. Basenexzisionsreparatur:** die fehlerhafte Base wird mit benachbarten Nukleotiden zunächst ausgeschnitten und anhand des Gegenstrangs neu synthetisiert; **3. Nukleotidexzisionsreparatur:** Eliminierung mehrerer Nukleotide und Neusynthese über die Information des Gegenstrangs; **4. Mismatch-Reparatur:** Entfernung von Basen-, Insertions- und Deletionsfehlpaarung und Neusynthese über den Gegenstrang; **5. Doppelstrangbruch-Reparatur:** Erfolgt über homologe Rekombination (als Muster dient das homologe Chromosom) oder nicht-homologe Endenvereinigung (als Muster dienen die Enden des Doppelstrangbruchs ohne Beachtung der Homologie) [Vohr, 2012].

Im humanen Genom sind etwa 125 Gene direkt an der DNA-Reparatur beteiligt [Ganten & Ruckpaul, 2007]. So werden spezifische Gene beispielsweise für die homologe Rekombination (z.B. RAD51, XRCC2 oder BRCA1) oder für die Mismatch-Reparatur (z.B. MSH2 oder MSH3) benötigt. Die Gene der Fanconi Anämie (FA) sind vor allem für die Überwachung und Reparatur von DNA-Crosslinks verantwortlich. Derzeit sind 13 Komplementationsgruppen bekannt: zwölf Gene auf autosomalen Chromosomen (Fanc A, C, D (D1 & D2), E, F, G, I, J, L, M, und N) und ein Gen auf dem gonosomalen Chromosom X (Fanc B). Da beispielsweise Fanc D1 mit dem Brustkrebsgen BRCA2⁹ identifiziert werden kann, wird der Signalweg der DNA-Reparatur auch als *FA/BRCA Pathway* bezeichnet. Der Angriffspunkt aller Fanc-Gene ist die S-Phase des Zellzyklus [Deakyne & Mazin, 2011]. Eine kurze Übersicht ist hierzu in Abbildung 4 dargestellt. Wichtig für die Erkennung von DNA-Schäden nach der Replikation ist die Ausbildung eines Kernkomplexes, der aus acht dieser dreizehn Fanc-Genen besteht (Fanc A, B, C, E, F, G, L und M). Der Kernkomplex besitzt durch Fanc L eine E3-Ubiquitin-Ligase-

⁷ thermische Zerstörung der glykosidischen Bindung zwischen den Purinen und dem Desoxyribosering

⁸ Entstehung von hypoxanthin- oder uracilhaltigen Nukleotiden aus Adenin und Cytosin

⁹ BRCA (BRCA1 und BRCA2) ist ein Risikogen, das erblichen Brust- oder Eierstockkrebs auslösen kann

Aktivität, die für die Mono-Ubiquitinierung des Fanc D2 benötigt wird. Dieser Prozess verwendet Ubiquitin als Aktivierungsmolekül und kann nur unter Anwesenheit von Fanc I erfolgen. Anschließend interagiert das mit Ubiquitin aktivierte Fanc D2 mit dem BRCA, sodass die DNA-Reparatur ablaufen kann [Mathew, 2006]. So erfüllt jedes Fanc-Gen seine Aufgabe (Tabelle 2) zur Erhaltung der Chromosomenstabilität und Korrektur der durch Replikationsfehler entstehenden DNA-Crosslinks. Die Interaktion der Fanc-Gene mit anderen DNA-Reparaturgenen, wie etwa BRCA1, BRCA2, Bloom's Helikase oder RAD51-Rekombinase, wurde in der Literatur nachgewiesen [Deakyne & Mazin, 2011].

Tabelle 2 funktionelle Übersicht der 13 Fanconi-Anämie-Gene

Die Klassifikation (FA-Kernkomplex, FA-ID-Komplex und Downstream) der 13 Fanc-Gene beruht auf der Funktionsweise und Zusammenarbeit der entstehenden Proteine während der S-Phase des Zellzyklus. [Deakyne & Mazin, 2011]

	Fanc-Gen	Funktion
FA-Kernkomplex	Fanc A	Wichtig für den Zugang eines ERCC1-XPF-Proteins zur Aushängung des Crosslinks
	Fanc B	Kernlokalisierungssignal
	Fanc C	Beteiligt an homologe Rekombination
	Fanc E	Verbindet Fanc L mit Fanc D2
	Fanc F	Beteiligung an der Organisation und Bildung des Kernkomplexes [Ahmad & Kirk, 2006]
	Fanc G (XRCC9)	Beteiligt an der homologe Rekombination; Besitzt verschiedene Motive, die für unterschiedliche Komplexbildungen benötigt werden
	Fanc L	E3-Ubiquitinligase mit PHD-Fingermotiv (Zinkfingermotiv) für die Ubiquitinbindung an das Fanc D2 des FA-ID Komplex
	Fanc M	Fungiert als „Landeplatz“ und als Motor für die andere FA-Gene des Kernkomplexes
FA-ID-Komplex	Fanc I	Gegenseitige Aktivierung mit Fanc D2, d.h. Fanc I wird für die Ubiquitinierung von Fanc D2 benötigt
	Fanc D2	Gegenseitige Aktivierung mit Fanc I → bindet an dsDNA-Enden
Downstream	Fanc N	Reguliert die Fanc D1-Funktion; Stellt eine Verbindung zwischen Fanc D1 und BRCA1 her
	Fanc D1 (BRCA2)	Reguliert RAD51 und DMC1
	Fanc J (BRIP1)	5'-3' ATPase abhängige dsDNA, für die direkten Verarbeitung von DNA-Schäden

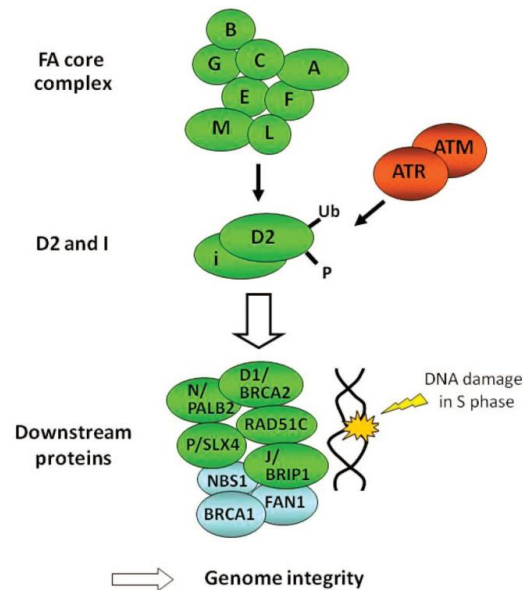


Abbildung 4 Übersicht des FA/BRCA Pathway

Acht der identifizierten FA-Proteine bilden einen Kernkomplex im Nukleus aus, welcher eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität durch Fanc L besitzt. Das nächste zentrale Ereignis im Pathway ist die Mono-Ubiquitinierung von Fanc D2 in Verbindung mit Fanc I. Das durch Ubiquitin aktivierte Fanc D2 interagiert mit den Downstream Proteinen (BRCA1, RAD51, BRCA2 und Fanc J) um die DNA-Reparatur einzuleiten. [Soulier, 2011]

Bei allen Fanc-Genen handelt es sich um Tumorsuppressorgene, sogenannte Caretaker-Gene, die für die genetische Stabilität durch die Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden unserer Körperzellen verantwortlich sind. Die Inaktivierung dieser spezifischen Tumorsuppressorgene durch Mutationen führt zur Hemmung der Proteinexpression, sodass der oben beschriebene Pathway für die Korrektur der fehlerhaften DNA-Rekombinationsereignisse gestört werden kann. Erfolgt beispielsweise eine Mutation in einem für die Kernkomplexbildung wichtigen Gen kann der Komplex nicht mehr vollständig ausgebildet werden. Tritt eine Mutation in Fanc I auf, kann die Mono-Ubiquitinierung von Fanc D2 nicht ablaufen. Bei allen somatischen Mutationseignissen kann entweder die DNA-Schädigung nicht lokalisiert oder nur unzureichend oder falsch repariert werden. Die Folgen sind Chromosomeninstabilitäten in den Zellen [Levitus et al., 2004; van Zeeburg et al., 2005]. Ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Neoplasien und dem Ausfall von DNA-Reparaturgenen scheint deshalb als schlüssig [Ganten & Ruckpaul, 2007]. Neben diesen somatischen Mutationseignissen gibt es aber auch die Fanconi Anämie, die in der Keimbahn ihren Ursprung findet. Diese Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und reicht von Symptomen wie anatomischen Fehlbildungen und Knochenmarksinsuffizienz bis hin zur Prädisposition für Krebserkrankungen [Levitus et al., 2004; Wreesmann et al., 2007]. Weltweit sind ca. 1-5 Millionen Fanconi-Anämie-Patienten in allen ethnischen Gruppen zu finden. Die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt ca. 20 Jahre [Deakne & Mazin, 2011]. Die Todesursachen sind oft Knochenmarksinsuffizienz, Leukämie

oder die Erkrankung an Plattenepithelkarzinomen [van Zeeburg et al., 2005]. Aus der Literatur ist bekannt, dass Patienten mit Fanconi Anämie besonders anfällig für die Ausbildung von Neoplasien im Kopf- und Halsbereich sind. Das Risiko ist um das 500- bis 700-fache erhöht [Kutler et al., 2003a; Kutler et al., 2003b; Rosenberg et al., 2003]. Außerdem treten Tumorerkrankungen häufig in einem frühen Lebensstadium auf. Die in dieser Arbeit untersuchten FA-Gene sind die an der Kernkomplexbildung beteiligten Proteine Fanc G und Fanc F sowie das für die Erkennung des DNA-Schadens wichtige Protein Fanc J. Diese drei Gene werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Fanc J ist das am wenigsten erforschte Protein im FA-Pathway und wurde erstmals 2005 in der Literatur näher beschrieben [Levitus et al., 2005, Levran et al., 2005, Litman et al., 2005]. Die mit Fanc J assoziierten Bezeichnungen sind BACH1 und BRIP1. Das Gen interagiert mit dem Brustkrebsgen BRCA1 und stellt so eine Verbindung mit dem FA-Pathway her [Litman et al., 2005, Xie et al., 2012]. Diese Interaktion führt zu einer erhöhten genomischen Stabilität [Xie et al., 2012]. Fanc J ist eine Helikase, deren Aktivität folglich wichtig ist für die reguläre zelluläre Reparatur [Cantor & Guillemette, 2011]. Mutationen in Fanc J sind einerseits assoziiert mit erblichen Brustkrebs und andererseits mit Krebserkrankungen in Patienten mit Fanconi Anämie [Cantor & Guillemette, 2011]. Eine Studie von *Wreesmann et al.* hinsichtlich der Untersuchung der Herunterregulierung von Fanc-Genen in Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs zeigte, dass Fanc J mit am häufigsten davon betroffen war. Demzufolge konnte die Expression bis um das 40-fache reduziert sein [Wreesmann et al., 2007].

Fanc G war ursprünglich das dritte identifizierte Fanc-Gen und wurde erstmals 1998 von *de Winter et al.* beschrieben [de Winter et al., 1998]. In dieser Studie wurde die Analogie zu dem im menschlichen Körper vorkommenden XRCC9 festgestellt. Fanc G interagiert mit Fanc A und steht auch in Verbindung mit Fanc F. Außerdem hilft dieses bei der Ausbildung des Kernkomplexes [Demuth et al., 2000]. Mutationen in Fanc G führen laut *Gallmeier et al.* zu chromosomalen Instabilitäten in verschiedenen Krebsarten [Gallmeier et al., 2006]. *Mathew* beschrieb eine Verbindung des Allelverlusts in Fanc G mit einer Krebsentwicklung im Pankreas [Mathew, 2006]. In der Studie von *Wreesmann et al.* zeigte Fanc G nur bedingt eine verminderte Expression im Vergleich zu anderen Fanc-Genen [Wreesmann et al., 2007]. Allerdings sind etwa 8-10 % aller FA-Patienten von Mutationen in diesem Gen betroffen [Mathew, 2006].

Fanc F wurde erstmals von *de Winter et al.* im Jahr 2000 beschrieben [de Winter et al., 2000]. Es besitzt eine Stabilisierungsfunktion für die Bildung von multimeren FA-Komplexen [Ahmad & Kirk, 2006] und interagiert mit Fanc A, Fanc C und Fanc G. Außerdem ist Fanc F für die Stabilisierung einerseits eines Komplexes aus Fanc A und Fanc C und andererseits eines

Komplexes aus Fanc A und Fanc G verantwortlich [de Winter et al., 2000]. In der Literatur ist bekannt, dass eine Methylierung von Fanc F zu einer verringerten Expression führt und letztendlich zur Ausbildung von Eierstock- [Taniguchi et al., 2003], Brust- [Olopade & Wie, 2003], Lungen- [Marsit et al., 2004], Gebärmutterhals- [Narayan et al., 2004] und/oder Hodenkrebs [Koul et al., 2004]. Auch die Entwicklung von Karzinomen im Kopf- und Halsbereich sind denkbar [Marsit et al., 2004]. Bei der Untersuchung von Fanc-Genen in Plattenepithelkarzinomen zeigte *Wreesmann et al.*, dass Fanc F, ähnlich wie Fanc J, von einer Herunterregulierung mit am häufigsten betroffen war (ca. 40-fach) [Wreesmann et al., 2007]. Mutationen in Fanc F kommen in FA-Patienten mit etwa 2 % vor [Mathew, 2006].

Die für dieses Projekt ausgewählten Fanc-Gene Fanc F, Fanc G und Fanc J wurden in anderen Studien noch nie als genetische Marker hinsichtlich der genaueren Definition des Krankheitsverlaufs von Patienten mit einer Plattenepithelkarzinomentwicklung in der Mundhöhle untersucht. Gegebenenfalls existiert aufgrund der genetischen Disposition der drei Fanc-Gene eine prognostische Relevanz, indem eine Assoziation mit anderen klinischen Parametern gefunden wird.

Bevor ich mit der Darstellung der Ergebnisse fortfahre, möchte ich im folgenden Kapitel die verwendeten Materialien vorstellen. Anschließend folgt die Beschreibung der experimentellen Durchführung.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit benötigten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software sowie verschiedene Stammlösungen und Puffer beschrieben.

3.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Name	Artikelnummer	Firma
10 x pH 8,3 Tris-Acetat-EDTA Puffer	106023	Merck KGaA
100% Ethanol	1.08543.0250	Merck KGaA
Agarose	11404	SERVA Electrophoresis GmbH
Bromphenolblau	1081220005	Merck KGaA
Chirurgische Einmalskalpelle	2800115	Tecnocut
Glycerol	356352	Merck KGaA
Ethidiumbromid	46067	Sigma-Aldrich
Falcon Tube (15 ml)	188271	Greiner bio-one GmbH
GeneScan™ -500 LIZ® Size Standard	4322682	Applied Biosystems
Hi-Di™ Formamide	4311320	Applied Biosystems
1 kb Plus DNA Ladder	10787-018	Invitrogen
Magnesium Solution 25mM	2200010	5PRIME
MgCl ₂	814733	Merck KGaA
PBS mit CaCl ₂ und MgCl ₂	14080-048	Invitrogen
PCR-Reaktionsgefäße	673210	Greiner bio-one GmbH
POP-7™ Polymer	4363785	Applied Biosystems
Primer antisense	4500005	Applied Biosystems
Primer sense	4500007	Applied Biosystems
QIAamp DNA Mini Kit	51306	QIAGEN GmbH
QIAGEN Multiplex PCR Kit	206143	QIAGEN GmbH
Reaktionsgefäße	72.706.400	Sarstedt
Running Buffer	402824	Applied Biosystems

Saccharose	107687	Merck KGaA
Tris	108387	Merck KGaA
Triton	108603	Merck KGaA
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	2200020	5PRIME
10x Taq Puffer	2200020	5PRIME
dNTPs	32003.303	Eppendorf AG

3.1.2 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Elektrophoresekammer	POWER NPAC 200; Mini-Sub [®] Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Inkubator	Thermomixer 5436	Eppendorf AG
Sequencer	3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Kühlschrank	Comfort	Liebherr
Magnetrührer	RH basic 2	IKA
Mikrowelle	700W	Goldstar
Mikrozentrifuge	Galaxy MiniStar	VWR International
PCR Thermocycler	MJ Min [™] Personal Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories
	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG
Photometerküvetten	0030 106.300 (Uvette [®] 220 - 1600 nm)	Eppendorf AG
Präzisionswaage	CPA225D	Sartorius
UV-Transluminator	AplaDigiDoc [™] RT	Biozym Scientific GmbH
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus Laboratory Centrifuges
	Centrifuge 5430	Eppendorf

3.1.3 Software

Anwendungsgebiet	Software	Firma
Fragmentanalyse	Foundation Data Collection Version 3.0	Applied Biosystems
Fragmentanalyseauswertung	GeneMapper v.4.0	Applied Biosystems
PCR-Programm	Bio-Rad CFX Manager 2.1 File Version: 2.1.1022.0532	Bio-Rad Laboratories
Auswertung der Elektropherogramme	Excel 2007	Microsoft® Office Excel® 2007
Statistische Auswertung	IBM SPSS Statistics Version 19	IBM®

3.1.4 Stammlösungen und verwendete Puffer

Herstellungssubstanz	Zusammensetzung
2,5 % ige Agarose	2,5 % Agarose 10x TAE-Puffer
C1 Puffer	43,81 % Saccharose 0,41 % MgCl ₂ 0,49 % Tris 4 % Triton (100%ig) dest. Wasser
dNTP's	1,25 % dATP 1,25 % dGTP 1,25 % dTTP 1,25 % dCTP dest. Wasser in Stock aliquot bei -80 °C lagern
DNA-Ladungspuffer	0,15 % Bromphenolblau 30 % Glycerol dest. Wasser Stock Aliquot-Konzentration 0,1 µg/µl
1 kb Plus DNA Ladder	10 % 1 kb Plus DNA Ladder 15 % Blue Dye dest. Wasser

3.2 Methoden

Die folgenden Abschnitte beschreiben die benötigten Methoden für die Detektion eines genetischen Verlusts beim Vergleich des Tumorgewebes mit dem korrespondierenden Blut in Verbindung mit allen durchgeführten Laborversuchen. Eine Zusammenfassung, in der die einzelnen Meilensteine für eine erfolgreiche LOH-Analyse dargestellt sind, erfolgt in Abbildung 5. Zunächst wurden geeignete Mikrosatellitenprimer, die in der Nähe der zu untersuchenden Genloci binden, über eine Literaturrecherche ausgewählt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Patientenkollektivs. Hierzu wurden die Plattenepithelkarzinomgewebe und die korrespondierenden Blutproben zu jedem Patienten herausgesucht und die DNA extrahiert. Nebenbei erfolgte die Erhebung der klinischen Patientendaten. Danach wurde mit den Mikrosatellitenprimern eine Multiplex-PCR etabliert und die daraus resultierenden PCR-Amplifikate einer kapillarelektrophoretischen Fragmentanalyse unterzogen. Anschließend wurden die Elektropherogramme mit der jeweiligen Blut- und Tumor-DNA rechnerisch auf einen möglichen genetischen Verlust ausgewertet. Zum Schluss erfolgte die statistische Auswertung der LOH-Daten in Zusammenhang mit den klinischen Patientendaten.

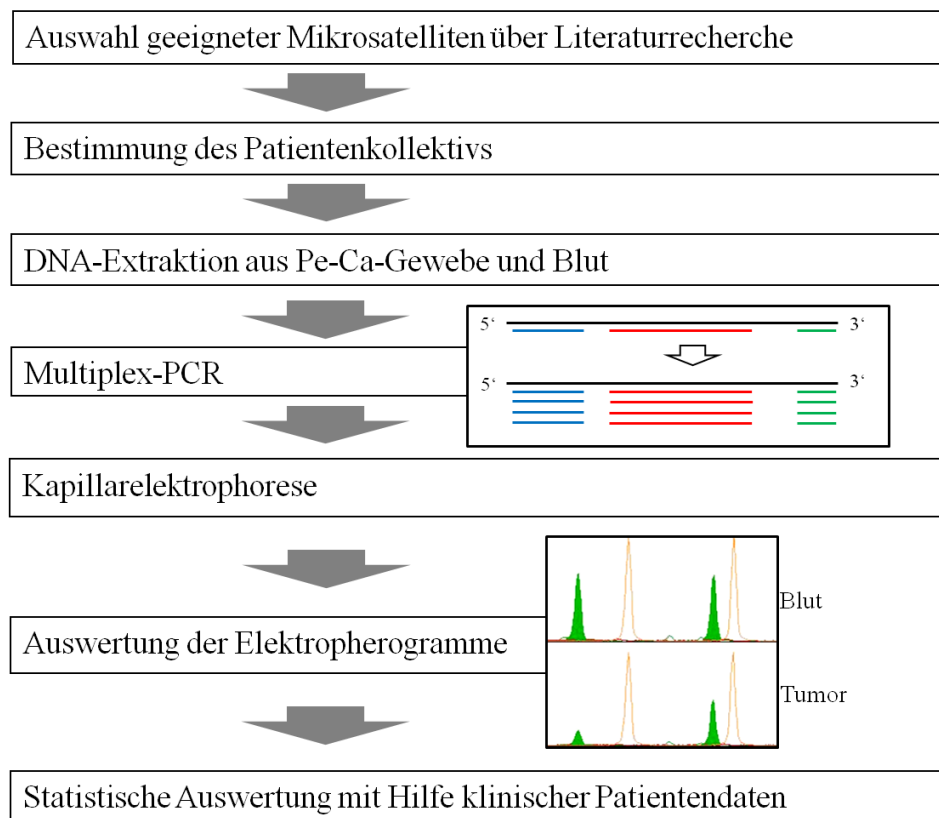


Abbildung 5 Arbeitsschritte der LOH-Analyse

3.2.1 Mikrosatelliten

Die Mikrosatellitenanalyse stellt derzeit die etablierteste Methode zum Nachweis genetischer Veränderungen dar. Da Mikrosatelliten vor allem in Abschnitten zwischen den Genen, aber auch in den Introns aufzufinden sind [Strachan, 1994], wurde mit Hilfe der Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) eine Längenanalyse in der Nähe der drei, zur Auswahl stehenden Genloci vorgenommen. Hierzu wurden spezifische Oligonukleotide (Primer) verwendet, die die interessanten Genloci flankierten. Insgesamt konnten acht Primerpaare ausfindig gemacht werden: drei für den Genlocus *Fanc G* auf dem Chromosom 9, drei für den Genlocus *Fanc F* auf dem Chromosom 11 und zwei für den Genlocus *Fanc J* auf dem Chromosom 17. Die Primer wurden aus dem Literaturbestand von *Pubmed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) auf Basis der internierenden Chromosomenregion ausgewählt. In Abbildung 6 sind die Positionen der ausgewählten Primer mit Lokalisation des zu untersuchenden Gens dargestellt. Sechs Primer (D9S1853, D9S171, D9S163, D11S1359, D17S1855 und D17S1607) waren Mikrosatellitenmarker, die Dinukleotidrepeats (CA/GT-Repeat) flankierten; zwei Primer (D11S1392 und D11S1981) waren Mikrosatellitenmarker, die Tetranukleotidrepeats flankierten.

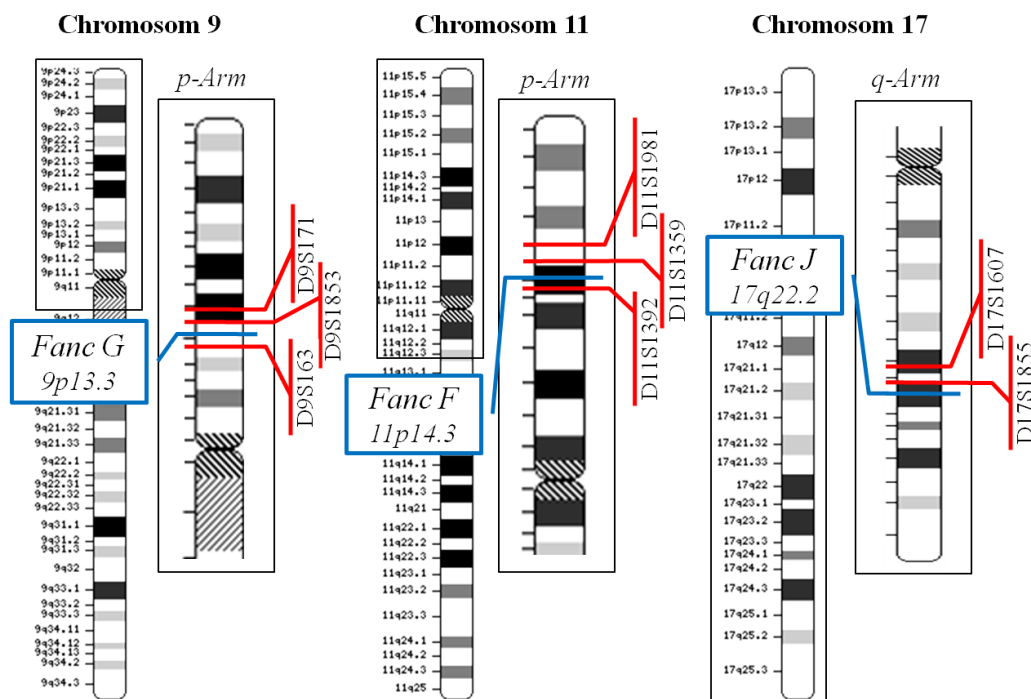


Abbildung 6 Lokalisation der Primer auf den drei Chromosomen

Das Gen *Fanc G* befindet sich auf dem p-Arm des Chromosom 9 und wird durch drei Primer (D9S1853, D9S171, D9S163) bei der LOH-Analyse amplifiziert werden. Das Gen *Fanc F* ist auf dem p-Arm des Chromosom 11 lokalisiert und wird ebenfalls durch drei Primer (D11S1981, D11S1359, D11S1392) amplifiziert. Das dritte Gen *Fanc J* befindet sich auf dem q-Arm des Chromosom 17 und wird durch zwei Primer (D17S1607, D17S1855) vervielfältigt werden. Die dargestellte Position der Primer und der Gene sind nur ungefähre Angaben auf dem Ideogram; die Anordnung ist ordnungsgemäß. [modifiziert nach UniSTS des NCBI]

Ein Primerpaar bestand jeweils aus einem Forward- (sense) und einem Reverse-Primer (antisense). Bei einer Fragmentanalyse der PCR-Amplifikate muss einer der beiden Primerpaare fluoreszenzmarkiert sein, damit die Amplifikate später mit Hilfe der Kapillarelektrophorese und einem Laserdetektionssystem lokalisiert werden können. Ohne diese Fluoreszenzfarbstoffe wäre eine Fragmentanalyse mit Hilfe der Kapillarelektrophorese nicht möglich. Mögliche Farbstoffe sind beispielsweise 6-FAM (blau), NED (schwarz), PET (rot) oder VTC (grün). Ein geeignetes Verarbeitungsprogramm, wie etwa *GeneMapper® Software Version 4.0*, verarbeitet die Daten des Fluoreszenzfarbstoffs an den PCR-Amplifikaten, sodass die Größe der Fragmente anschließend berechnet werden kann (siehe Kapitel 4.2.8.1). In Tabelle 3 werden die acht Primerpaare mit ihren Sequenzen, Labeling, Produktgröße und dem Literaturnachweis vorgestellt.

Tabelle 3 Primer für die LOH-Analyse

Die Primer für die LOH-Analyse werden für die Detektion der entsprechenden Genloci benötigt. Der Forward-Primer ist fluoreszenzmarkiert. Weiterhin wird in der Tabelle die Produktgröße sowie die DNA-Sequenz und der Literaturnachweis angegeben.

Primer	Sequenz	Labeling	Produktgröße	Literaturnachweis
D9S171 s	AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT	VTC	158-177	[Idbaih et al., 2008], [Van Zeeburg, 2005], [Nagao et al. 2000]
D9S171 as	ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT			
D9S1853 s	GATCCAGCCTCACTGAA	6-FAM	247-265	[Idbaih et al., 2008], [Demuth et al., 2000]
D9S1853 as	TTGGGCATAGAATTTTACTTT			
D9S163 s	TGCTGCACATCTTAGGGAGT	NED	270-271	[Idbaih et al., 2008], [Tarmin et al., 1994]
D9S163 as	ACAGCGCTCAGAAATCATATAA			
D11S1359 s	TTGGAAGACACATGCACAAA	NED	148	[de Winter et al., 2000]
D11S1359 as	ATTTTCCAGCCTCCATAATC			
D11S1981 s	AATTCCTTACTCCAGAAAGG	VTC	134-178	[Chen et al., 2003]
D11S1981 as	CAGATTTCTGCTTTCCCAGA			
D11S1392 s	TTGCATCCATACGGAAAGTC	6-FAM	200-220	[Powlesland et al., 2000]
D11S1392 as	ACATCTGAGACTTGTAGTAGAAGGC			
D17S1607 s	CAGATAAAAAACACAAGTTTCTGAC	NED	103-123	[Orsetti et al., 1999]
D17S1607 as	GCTCCACCCCAGACCTA			
D17S1855 s	GGGGACCNTAGAAACC	PET	219-225	[Orsetti et al., 1999], [Indraccolo et al., 2006]
D17S1855 as	GAGAATACATTGTAACAACCTCCAGT			

Die benötigten Primer wurden bei der Firma *Applied Biosystems* synthetisiert. Sie wurden nach Angaben des Herstellers auf eine Stocklösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μl angesetzt. Anschließend wurden Aliquots mit einem Volumen von 20 μl entnommen (100 μM).

Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Aus diesen Aliquots wurde eine 5 µM Working Solution erzeugt (95 µl dest. Wasser und 5 µl Aliquot), die danach bei -20 °C gelagert wurde.

Bei einer Mikrosatellitenanalyse können zwei Allele eines Genlocus entweder homozygot oder heterozygot sein. Bei einem homozygoten Auftreten besitzen die Mikrosatelliten auf beiden Allelen dieselbe Länge; bei einem heterozygoten Verhalten weisen die Mikrosatelliten eine unterschiedliche Länge auf beiden Allelen auf. Hat ein Patient verschiedene Allele von seiner Mutter und von seinem Vater geerbt, also im Falle der Heterozygotie, kann durch den Vergleich von Normal- und Tumor-DNA ein LOH festgestellt werden. Folgendermaßen kann die Mikrosatellitenanalyse nur bei Patienten mit einem heterozygoten Genotyp ausgewertet werden (Kapitel 3.2.8.1). Mit der Verwendung von mehreren Mikrosatellitenprimern eines zu untersuchenden Genlocus kann die Heterozygotie-Frequenz erhöht werden. So wird die Wahrscheinlichkeit einer heterozygoten Konstellation in einer Genregion und letztendlich auch die Detektion eines LOH gesteigert.

3.2.2 Patientenkollektiv und klinische Patientendaten

Das untersuchte Tumormaterial wurde aus einer aktuellen Tumorbank der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKG) des Uniklinikum Dresdens herausgefiltert. Die Bank umfasste 523 Karzinome unterschiedlicher Stadien und Lokalisationen. Kriterien für die Auswahl des geeigneten Untersuchungsmaterials für die Allel-Verlust-Analyse waren die TNM-Klassifikation sowie die Rezidivität des Karzinoms, also das Wiederauftreten eines bösartigen Tumors nach vorheriger Resektion.

Bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials aus der Tumorbank (Tabelle 4) wurden Plattenepithelkarzinome verwendet, die das Stadium T3 oder T4 aufwiesen und möglichst nicht rezidiv auftraten. Fünf Tumorproben wurden im Nachhinein dem Primärtumorstadium T2 zugeordnet. Eine vor der Resektion unterschriebene Einverständniserklärung für die wissenschaftliche Nutzung des Tumorgewebes war von jedem einzelnen Patienten vorhanden. Für die Allel-Verlust-Analyse konnte das Tumormaterial sowie das dazugehörige Blut von insgesamt 54 Patienten verwendet werden. Die Resektion der Karzinome wurde zwischen 1993 und 2007 durchgeführt. Sowohl die Tumor- also auch die Blutproben wurden während der Operation in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend bei -80°C kryokonserviert. Um die Anonymität der Erkrankten zu gewährleisten, wird im Folgenden ausschließlich die Tumornummer angegeben werden.

Tabelle 4 Patientenkollektiv für die LOH Analyse

Bei dem Tumormaterial handelt es sich um Plattenepithelkarzinome (Pe-Ca) im Bereich des Unterkiefers (UK) und Oberkiefers (OK), des Mundbodens (MuBo), der Mundhöhle und der Zunge. Zum Teil wurde auch eine Plattenepithelkarzinomentwicklung an der Schleimhaut, der Unterlippe (UL), dem Gaumen und der Tonsille sowie in der Kieferhöhle, der Nase und vereinzelt auch in der Augenhöhle lokalisiert. Zum Zeitpunkt der Auswertung waren einige Patienten noch am Leben; diese sind mit einem Stern in der ersten Spalte gekennzeichnet. Bei einem Fragezeichen war die spezifische Kategorie unbekannt.

Nr.	Geschlecht	Erkrankungs- alter	T	N	M	G	Lokalisation
2	w	86	4	2	0	2	Pe-Ca UK
3	m	46	4	2	1	2	Pe-Ca Zunge/MuBo
7	m	61	3	2	0	2	Pe-Ca MuBo
14	m	32	4	2	0	2	Pe-Ca MuBo/Zungenrand
15	w	48	4	2	0	3	Pe-Ca MuBo/Zunge
20*	m	67	4	0	0	1	Pe-Ca Wange/UK
23	m	58	4	3	0	2	Pe-Ca MuBo/UL
26	m	68	4	2	0	3	Pe-Ca MuBo/Zunge
27	m	79	4	2	0	2	Pe-Ca Zunge
30	w	44	4	2	0	2	Pe-Ca MuBo
37	w	84	4	0	0	?	Pe-Ca OK
40	m	42	4	2	0	2	Pe-Ca MuBo
48	m	58	4	1	0	2	Pe-Ca Zunge
53	m	71	4	0	0	2	Pe-Ca MuBo/Zunge
60	m	63	3	1	0	2	Pe-Ca Tonsille
101	m	46	3	2	0	?	Pe-Ca MuBo/Zunge
107	m	55	4	1	0	2	Pe-Ca OK/Kieferhöhle/Augenhöhle/ Jochboden/Siebbein
114	m	58	4	0	0	?	Pe-Ca MuBo/Wange/Kieferhöhle
116	m	51	4	2	0	?	Pe-Ca Mundschleimhaut
117	m	41	4	2	0	2	Pe-Ca MuBo/Zunge
118*	m	58	3	1	0	?	Pe-Ca MuBo/UK
120	m	64	4	?	?	2	Pe-Ca UK
121	m	61	4	?	?	2	Pe-Ca Gaumenbogen
123	m	66	4	2	0	2	Pe-Ca UK
144*	m	36	4	2	0	2	Pe-Ca Gaumenbereich
150	w	85	4	2	0	1	Pe-Ca OK
152	m	70	4	0	0	?	Pe-Ca OK
154*	m	60	3	1	0	?	Pe-Ca MuBo/Zungengrund
155*	m	64	4	0	0	2	Pe-Ca OK/Kieferhöhle/Nase/Orbita
157	m	52	4	0	0	2	Pe-Ca UK
171	m	73	2	2	0	2	Pe-Ca Zungengrund
179	w	82	4	1	0	2	Pe-Ca UK
180	w	62	4	1	0	2	Pe-Ca MuBo
181*	w	68	4	0	0	2	Pe-Ca UK
185*	m	52	4	2	?	2	Pe-Ca MuBo/Zungengrund
193	w	69	3	1	?	3	Pe-Ca UK

Nr.	Geschlecht	Erkrankungs- alter	T	N	M	G	Lokalisation
196	w	66	4	2	0	2	Pe-Ca UK
206	m	59	2	0	0	?	Pe-Ca UK
213*	m	59	4	0	0	?	Pe-Ca UK/Gaumen
325	w	38	2	1	0	2	Pe-Ca Zunge
326*	m	75	2	0	0	3	Pe-Ca Kieferhöhlen
328	m	59	3	2	0	2	Pe-Ca UK/Zungengrund/Wange/ Tonsille
336	w	41	4	0	0	2	Pe-Ca Nase
385	m	61	4	2	0	3	Pe-Ca MuBo/Zungenrand
386*	m	60	3	0	0	2	Pe-Ca Tonsille
393	w	55	4	2	0	2	Pe-Ca OK
401*	m	60	2	0	0	3	Pe-Ca Gaumenbereich
409 [?] *	m	67	3	0	0	2	Pe-Ca OK
457	m	36	4	0	0	2	Pe-Ca UK
458*	m	53	3	2	0	3	Pe-Ca MuBo/Zunge
474	m	42	4	1	0	2	Pe-Ca MuBo/Zunge
477*	w	65	4	0	0	1	Pe-Ca Regio 34 bis 47
478*	w	52	4	0	0	2	Pe-Ca MuBo
479	m	66	4	0	0	3	Pe-Ca Nase

Neben der Auswahl des Patientenkollektivs mussten auch die klinischen Patientendaten für eine spätere statistische Auswertung erhoben werden. Hierfür wurde mit dem *Regionalen Klinischen Krebsregister Dresden* zusammengearbeitet. Diese Organisation erfasst alle für die Erkrankung wichtigen Daten, wie etwa die genaue Diagnose, die Erstbehandlung oder auch Nachbehandlungen und eventuelle Rückfälle. Der zuständige Arzt darf auch hier die Daten nur übermitteln, wenn der Patient zuvor seine Einwilligung erteilt hat.

Für die statistische Auswertung der LOH-Daten sind folgende klinische Patientendaten wichtig (Anlage 1): Diagnosedatum; Sterbedatum; Patientenalter bei Diagnose; T-, N- und M-Stadium; Differenzierungsgrad; Rezidiv- und Metastasenstatus; Todesursache; Behandlung (Resektion, Radio- und/oder Chemotherapie); Nikotin- und Alkoholabusus. Bei dem untersuchten Patientenkollektiv waren die klinischen Daten von nahezu jedem Patienten vollständig verfügbar. Bei dem Patienten Nr. 409 waren keine Angaben zum Life-Status vorhanden. In manchen Fällen fehlte die genaue Bestimmung der N- und M-Stadien. Der Grenzwert für den Alkohol- bzw. Nikotinabusus wurde auf eine Zigarette pro Tag bzw. auf eine tägliche Konsumierung von Alkohol (in jeglicher Konzentration) festgelegt.

3.2.3 DNA-Extraktion

Aus den Plattenepithelkarzinomgeweben und den dazugehörigen Blutproben des zu untersuchenden Patientenkollektivs wurde die DNA für die LOH-Analyse gewonnen. Bei den Gewebeproben wurde ein ca. 4-5 mm großes Präparat in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend kam das *QIAamp DNA Mini Kit* von *QIAGEN GmbH* zum Einsatz. Es wurden 100 µl Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 180 µl *ATL Puffer* und 20 µl *Proteinase K* hinzugegeben. Die Gewebeschnitte wurden für etwa 1 h bei 56 °C inkubiert, bis sich die Gewebe restlos aufgelöst hatten. Anschließend wurden 200 µl *AL Puffer* hinzugegeben und das Gemisch für 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurde 200 µl 100%iges Ethanol als Lysat hinzugegeben. Der gesamte Reaktionsgefäßinhalt wurde in „Doppelreaktionsgefäße“ überführt und zentrifugiert (8000 U, 2 min, 20 °C). Die DNA des Plattenepithelkarzinoms wurde während der Zentrifugation an die Membran des oberen Reaktionsgefäßes gebunden. Nach dem Verwerfen des Durchflusses, wurde die Membran mit 500 µl *AW1-Waschpuffer* gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 20 °C und 8000 U. Anschließend wurde der Durchfluss erneut verworfen und 500 µl *AW2-Waschpuffer* hinzugefügt. Eine Zentrifugation bei 14000 U, 3 min, 20 °C schloss sich dem an. Nach Zugabe von 100 µl *AE Puffer* und einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur, folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 20 °C und 8000 U, sodass sich die DNA des Plattenepithelkarzinoms nun im *AE Puffer* befand. Der *AE Puffer* bewirkte eine Elution der gebundenen DNA aus der Membran. Die DNA-Extraktion aus Blutproben kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Der erste Fall verwendete ausschließlich Reagenzien, die auch in dem *QIAamp DNA Mini Kit* von *QIAGEN GmbH* enthalten waren. Hier wurde in ein Reaktionsgefäß zunächst 200 µl Blut, 20 µl *Proteinase K* und 200 µl *AL Puffer* gegeben. Anschließend folgte eine Inkubation bei 56 °C für 10 min. Die weiteren Arbeitsschritte zur Gewinnung der DNA aus dem Blut erfolgten nun analog zu dem Gewebematerial. Die zweite Möglichkeit schloss ein zusätzliches Reagenz, dem C1-Puffer, ein. Der C1-Puffer besteht aus 219,07 g Saccharose, 2,03 g Magnesiumchlorid, 2,43 g Tris und 20 ml Triton X. Alle Komponenten wurden mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml eingestellt. Zum Lösen wurde der C1-Puffer unter rühren leicht erwärmt. Für die DNA-Extraktion wurden 2 ml kaltes Blut sowie 2 ml C1-Puffer verwendet, die anschließend mit eisgekühltem destilliertem Wasser auf 15 ml aufgefüllt wurden. Danach folgten ein kurzes Schütteln und eine Zentrifugation (15 min, 2500 U, 4 °C). Der Überstand wurde abgegossen und ein Reaktionsgefäß mit 100 µl *PBS* vorbereitet, in das das zurückgebliebene Pellet umpipettiert und gelöst wurde. Danach erfolgt die Zugabe von 180 µl *AL Puffer* und 20 µl *Proteinase K*. Eine Inkubation bei 56 °C für 10 min schloss sich dem an. Die Behandlung der Blutproben zur Gewinnung der DNA erfolgte nun analog zu dem Gewebematerial.

Die DNA-Konzentrationsbestimmung wird im Labor üblicherweise in einer Küvette bei einer Wellenlänge von 260 nm vorgenommen. Die Konzentrationsmessung erfolgte mit Hilfe eines Photometers der Firma *Eppendorf AG*. Das Probenmaterial wurde 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend der Extinktionsmessung unterzogen. Die Reinheit der DNA-Lösung wird durch den OD-Wert angegeben. Das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ sollte ungefähr bei 1,8 liegen. Bei einer Konzentration von > 70 ng/μl wurde die DNA auf 50 ng/μl verdünnt. Betrug die Konzentration < 40 ng/μl wurde in den PCR-Ansätzen eine erhöhte DNA-Konzentration verwendet, sodass eine DNA-Schlusskonzentration von ca. 100 ng erreicht werden konnte.

Wird die Ausbeute der unterschiedlichen DNA-Gewinnungsmethoden aus dem Blutmaterial betrachtet, ist der Ertrag unter Verwendung des C1-Puffers effektiver, als wenn ausschließlich das Enzym *Proteinase K* zum Einsatz kommt. Dies liegt daran, dass der C1-Puffer die Zellen lysiert, während dieser die Zellkerne erhält und stabilisiert. Durch die Stabilisierung kann die anschließend verwendete *Proteinase K* die DNA ohne Verlust durch Lysierung des Zellkerns gewonnen werden.

3.2.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) wurde erstmals 1985 von *Saiki et al.* beschrieben und ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung („Amplifikation“) bestimmter DNA-Abschnitte in vitro mit Hilfe einer DNA-Polymerase und definierten synthetischen Oligonukleotiden, dem *sense* und *antisense* Primer [Saiki et al., 1985]. Die Methode der PCR beruht auf einer Wiederholung von mehreren Zyklen. Jeder Zyklus läuft in drei Schritten ab: die *Denaturierung*, das *Primer-Annealing* und die *Elongation*. Im Denaturierungsschritt wird bei 94 °C die Doppelhelix der Template-DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Dies geschieht durch die Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Doppelstrangs. Sogenannte hot-start DNA-Polymerase benötigen zur Aktivierung vor dem ersten Zyklus eine längere Erhitzungsphase mit bis zu 15 Minuten. Anschließend folgt der Annealingschritt bei ungefähr 55 °C, sodass die Primer spezifisch an die flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereichs hybridisieren können. Wird die Temperatur zu niedrig gewählt, können die synthetischen Oligonukleotide unter Umständen nicht 100 %ig an den komplementären DNA-Abschnitt binden und so zu unspezifischen Produkten („Geisterbanden“) führen. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, ist die thermische Bewegung der Primer so groß, dass sie sich nicht richtig anheften können, sodass keine oder nur eine ineffiziente Produktbildung beobachtet werden kann. Die optimale Primer-Annealingtemperatur lässt sich am besten über die Durchführung einer Gradienten-PCR ermitteln (siehe Kapitel 3.2.6).

Während der anschließenden Elongationsphase wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase eingestellt, um eine optimale Syntheseleistung des komplementären Strangs zu gewährleisten. Die DNA-Polymerase bindet dabei an das 3'-Ende des hybridisierenden Primers und synthetisiert mit Hilfe der vier Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) den komplementären Strang neu. Die Abfolge dieser drei Phasen in einem Zyklus führt zur Verdopplung des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, sodass bei mehrfacher Zyklenanzahl ein exponentielles Wachstum beobachtet werden kann. [Mülhardt, 2009]

Mit den für die Untersuchung benötigten DNA-Proben aus Plattenepithelkarzinomen und Blut der Patienten muss besonders sorgfältig und sparsam umgegangen werden. Deswegen wurde in dieser Arbeit keine einfache PCR durchgeführt. Aufgrund der speziellen Anforderungen durch die Verwendung von mehreren Primern und der geringen Verfügbarkeit von Template-DNA schien eine Etablierung einer Multiplex-PCR als sehr sinnvoll. Diese Methode wurde erstmals 1988 von *Chamberlain et al.* beschrieben [Chamberlain et al., 1988]. Sie findet vor allem Ihre Anwendung, wenn besonders wenig Template-DNA für eine Reaktion zur Verfügung steht und mehr als zwei Genloci gleichzeitig amplifiziert werden sollen. In Kapitel 3.2.6 erfolgt eine ausführlichere Erläuterung der Durchführung dieser Multiplex-PCR.

3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob die PCR mit einem bestimmten DNA-Template und den spezifisch eingesetzten Oligonukleotiden funktioniert hatte, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese Methode dient der Auftrennung von Biomolekülen nach deren Größe. So können mit Hilfe der Elektrophorese Unterschiede im Wanderungsverhalten der Moleküle im Gel beobachtet oder die Größe eines bestimmten DNA-Fragments mit Hilfe eines Größenmarkers bestimmt werden. Außerdem liefert die Intensität der unter UV-Licht sichtbaren Banden ein Indiz für eine hohe oder geringe DNA-Amplifikationsrate während der PCR [Mülhardt, 2009]. Die Grundvoraussetzung für die Agarose-Gelelektrophorese ist einerseits eine zur Verfügung stehende Gelmatrix und andererseits ein Elektrophoresepuffer an dem eine Spannung angelegt werden kann. Die Matrix bewirkt durch ihr engmaschiges Netz eine Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente nach deren Größe. Das heißt, je größer ein Fragment ist, desto langsamer durchläuft es die Matrix. Da die DNA durch ihre Phosphatreste negativ geladen ist, erfolgt die Wanderung dieser Fragmente im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.

Die Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit mit einer 2,5 %iger Agarosekonzentration und *Tris-Acetat-EDTA* (TAE) als Elektrophoresepuffer durchgeführt. Die Agarose, die zuvor in dem TAE-Puffer gelöst wurde, wurde mit Hilfe einer Mikrowelle erwärmt. Um die DNA in der Matrix visuell darstellen zu können, ist eine Färbung mit beispielsweise *Ethidiumbromid* (*EtBr*)

unumgänglich. Durch die mutagene Wirkung von EtBr auf Keimbahnzellen könnten aber auch andere Farbstoffe vorgezogen werden, wie etwas *SYBR Green I* oder *SYBR Gold*. Hierzu wurden etwa 30 ml flüssige Agarose in ein separates Zentrifugenröhrchen gegeben und 2 µl *EtBr* mit einer Konzentration von 0,025 mol/µl hinzugegeben. Anschließend wurde die flüssige Agarose in ein Gelschiffchen mit zuvor eingesteckter Kämme (Bildung der Geltaschen) zum Abkühlen gegossen. Nach Erstarrung des Gels wurde das Schiffchen in die Gelkammer gegeben und der Elektrophoresepuffer bis zur vollständigen Bedeckung des Gels aufgefüllt. Die zu untersuchenden PCR-Amplifikate wurden im nächsten Schritt verdünnt, damit noch genug Amplifikate für die Fragmentlängenanalyse (siehe Kapitel 3.2.7) zur Verfügung stand. Hierzu wurden 5 µl DNA entnommen und mit 3 µl destilliertem Wasser sowie 2 µl Bromphenolblau als Ladepuffer versetzt. Für die Herstellung des Ladepuffers wurde 0,075 g Bromphenolblau in 35 ml sterilem Wasser gelöst und mit 15 ml Glycerol versetzt. Anschließend wurden die verdünnten PCR-Amplifikate in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker kam *1 kb Plus DNA Ladder* mit einer Konzentration von 0,1 µg/µl zum Einsatz. Hiervon wurden 5 µl eingesetzt. Das Gel wurde bei einer Spannung von 80 V für etwa 35 min gefahren. Abschließend folgte eine fotografische Dokumentation für die Auswertung unter einem UV-Transluminator.

Die Agarose-Gelelektrophorese diente in dieser Arbeit als wichtiges Werkzeug einerseits für die Bestimmung der Annealingtemperatur während der Gradienten-PCR und andererseits als visuelles Hilfsmittel bei der Etablierung der Multiplex-PCR. Danach wurde ein Gel lediglich als Stichprobenkontrolle von zufällig ausgewählter Patienten-DNA durchgeführt, bevor die PCR-Amplifikate in der Kapillarelektrophorese einer Fragmentlängenanalyse unterzogen wurden (siehe Kapitel 3.2.7).

3.2.6 Etablierung der Multiplex-PCR

Bevor die Multiplex-PCR etabliert werden konnte, mussten zunächst die optimale Annealingtemperaturen über eine Gradienten-PCR aller acht Primerpaare (Tabelle 3) bestimmt werden. Hierzu benötigt man einen Thermocycler, der die Möglichkeit der Ausbildung eines Temperaturgradienten bietet. Es wurden insgesamt sechs mögliche Annealingtemperaturen ausgetestet: 51,2 °C; 53,4 °C; 56,3 °C; 59,9 °C; 62,8 °C und 64,9 °C. Bei 51,2 °C wurde immer die Negativkontrolle des angesetzten Mastermixes amplifiziert. Die benötigten Komponenten für die PCR (*Taq Puffer* und *Taq Polymerase*) stammen von der Firma *5PRIME*. Tabelle 5 gibt das Pipettierschema für die Bestimmung der Annealingtemperatur an und Abbildung 7 beschreibt das für die Amplifikation wichtige PCR-Programm.

Tabelle 5 Pipettierschema der Gradienten-PCR

Für die Gradienten-PCR wurde ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl verwendet.

Komponente	Menge
10x Puffer (mit 1,5mM Mg ²⁺)	2,5 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,1 µl
dNTPs	3,0 µl
Primer sense	1,0 µl
Primer antisense	1,0 µl
dest. H ₂ O	15,4 µl
DNA (50ng/µl)	2 µl

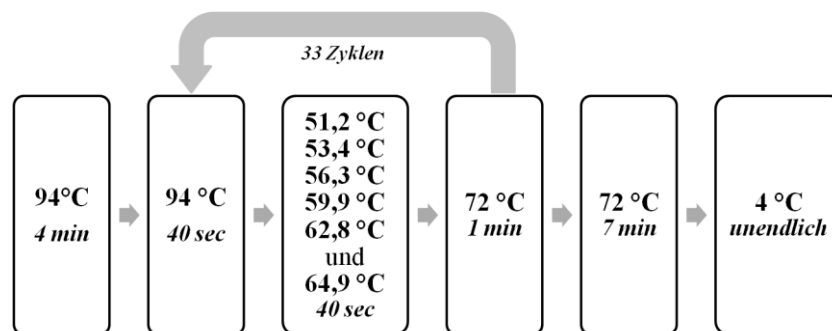


Abbildung 7 PCR-Programm für die Gradienten-PCR

Das PCR-Programm beschreibt die einzelnen Schritte der PCR. Zunächst wurde die Taq DNA Polymerase bei 94 °C aktiviert. Anschließend folgten die Denaturierung für 40 Sekunden, das Primer-Annealing für 40 Sekunden und die Elongation bei 72 °C für 1 Minute. Die PCR hatte insgesamt 34 Zyklen.

Die Gelelektrophoresebilder aller Primerpaare sind in Anlage 2 - Anlage 9 dargestellt. Die Annealingtemperatur war bei ca. 56 °C am günstigen. Folglich konnte diese Temperatur bei der Etablierung der Multiplex-PCR für das Primerannealing aller acht Primerpaare verwendet werden.

Bei einer Multiplex-PCR müssen für die bestmögliche Effizienz aller Primerpaare in einem Reaktionsansatz mehrere Parameter eingestellt werden. Hierzu zählen die relative Konzentration der Primerpaare, die PCR-Puffer-Konzentration, die Konzentration der einzelnen Nukleotide und der Magnesiumchloridionen (MgCl₂) sowie das Temperaturprofil der PCR-Reaktion (Annealingtemperatur) [Scholz et al., 2001]. Letzteres wurde bereits über die Gradienten-PCR erfolgreich bestimmt. Die Etablierung der Multiplex-PCR erfolgte mit dem *Multiplex PCR Kit* der Firma *QUIAGEN GmbH*. Darin enthalten ist die sogenannte *Q-Solution*. Es wurde ein Reaktionsansatz mit und ohne diese Komponente getestet. Die *Q-Solution* soll vor allem die Amplifikation schwieriger Templates durch das Abwandeln des Schmelzverhaltens der Nukleinsäuren bewirken und wird bei besonders CG-Reichen Templates angewendet. Da auf dem Gel kein signifikanter Unterschied zu erkennen war, wurde das Gemisch bei der Etablierung weggelassen. Nach optimaler Einstellung der Magnesiumchlorid- und

Primerkonzentration konnten aus den acht Primerpaaren vier Multiplex-PCR-Reaktionen etablieren werden. Die Amplifikation des Primerpaars *D9S1853* stellte sich als etwas schwieriger dar, weil keine Produktbildung in Kombination mit anderen Primerpaaren beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund wurde er einzeln in einem Reaktionsansatz gegeben und getrennt von anderen Primerpaaren amplifiziert. Das Ergebnis der Multiplex-PCR ist in der nachfolgenden Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6 Etablierte, funktionsfähige Primerkombinationen für die Multiplex-PCR

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 25 µl. Die Magnesiumionenkonzentration von 1,5 mM war im Reaktionsmix des *Multiplex PCR Kits* bereits vorhanden. Bei der ersten Kombination wurde die MgCl₂-Konzentration um 0,3 mM erhöht. Die eingesetzte DNA pro PCR-Ansatz betrug ca. 100 ng.

Kombination	Primer	c(Primer)	c(MgCl ₂)	c(DNA)
1	D9S171	0,20 µM	1,8 mM	100 ng
	D9S163	0,15 µM		
	D17S1607	0,30 µM		
2	D11S1392	0,20 µM	1,5 mM	
	D11S1359	0,20 µM		
3	D17S1855	0,20 µM	1,5 mM	
	D11S1981	0,20 µM		
4	D9S1853	0,20 µM	1,5 mM	

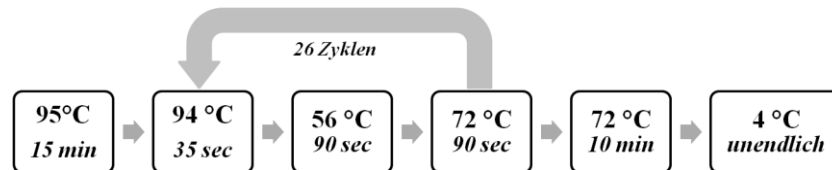


Abbildung 8 PCR-Programm für die Multiplex-PCR

Das PCR-Programm beschreibt die einzelnen Schritte der Multiplex-PCR. Zunächst wurde die hot-start Taq DNA Polymerase bei 95 °C für 15 Minuten aktiviert werden. Anschließend folgten die Denaturierung für 35 Sekunden, das Primerannealing bei 56 °C für 90 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 90 Sekunden. Die PCR hatte insgesamt 27 Zyklen.

3.2.7 Fragmentlängenanalyse

Bevor die Fragmentanalyse in der Kapillarelektrophorese durchgeführt werden konnte, musste die zuvor entwickelte Multiplex-PCR mit ihren vier Primerkombinationen angewendet werden. Hierzu wurden PCR-Amplifikate von jeweils 100 ng Tumor-DNA und jeweils 100 ng der dazugehörigen Blut-DNA aus den 54 untersuchten Patienten erzeugt. Die Template-Amplifikation erfolgte zu je 27 Zyklen im PCR-Thermocycler (Abbildung 8). So wurden für jede Kombination 108 DNA-Proben (54 Tumor-DNA und 54 Blut-DNA) bearbeitet und eine Negativkontrolle für jeden erzeugten Mastermix angelegt, damit eine Kontamination ausgeschlossen werden konnte. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 25 µl

einschließlich 2 µl eingesetzte DNA (entspricht 100 ng). Wenn die DNA-Konzentration von 80 ng unterschritten wurde, wurde dementsprechend mehr DNA eingesetzt und die Wassermenge im Mastermix verringert. Bevor die eigentliche Fragmentanalyse durchgeführt wurde, wurde die korrekte Funktionsweise der PCR überprüft. Hierzu wurde die Negativkontrolle und zufällig ausgewählte DNA-Amplifikate im Agarosegel überprüft.

Die Kapillarelektrophorese stellt ein analytisches Trennverfahren auf Grundlage einer mit Polymerlösung gefüllten Kapillare dar. Der Transport einer Probe durch die Kapillare beruht auf deren Ladung und die Trennung ist abhängig von der Molekülgröße. Letzteres erfolgt durch das in der Kapillare vorhandene Polymer (z.B. *POP-7™ Polymer*), welches als flüssige Matrix dient. Für die elektrophoretische Wanderung der Biomoleküle wird ein elektrisches Feld benötigt, das durch eine Spannung von ca. 30 kV erzeugt wird. Hierzu werden wässrige Puffersysteme mit einem konstanten pH-Wert benötigt. Die Trennsäulen besitzen einen Innendurchmesser von 50-100 µm. In Abbildung 9 ist der Aufbau eines kapillarelektrophoretischen Systems dargestellt. Die Grundlage der elektrophoretischen Trennung ist der *Elektroosmosefluss (EOF)*. Eine Vielzahl von Substanzen, wie beispielsweise Glas, Quarz oder Teflon, können aufgrund der Oberflächenladung in Verbindung mit einer elektrolytischen Lösung eine elektrochemische Doppelschicht ausbilden. Die Innenwandoberfläche der Kapillare ist negativ geladen und die Flüssigkeitssäule weist eine positive Ladung auf. Durch das Anlegen einer Spannung an die Elektroden kommt es mit Hilfe des flüssigen Elektrolytsystems zur Ausbildung eines elektrischen Felds, sodass der EOF erzeugt wird. Die Wanderung der Probe durch den elektroosmotischen Fluss erfolgt in Richtung Kathode aufgrund ihrer positiven Ladung. Dabei wandern kleine einsträngige DNA-Fragmente schneller als größere. Über ein Detektionsfenster an den Kapillaren regt ein Laser-Detektionssystem die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente mit Fluoreszenzlicht an. Anschließend werden die Signale in Abhängigkeit von der Zeit als Elektropherogramm erfasst. Es entstehen die sogenannten Peaks. Mit einem Größenstandard (*GeneScan™-500 LIZ® Size Standard*) wird die genaue Größenbestimmung der detektierten DNA-Fragmente vorgenommen. [Engelhardt et al., 1994; Misholi, 2010]

Der Automat *3130xl Genetic Analyzer* von *Applied Biosystem* besitzt eine solche Kapillarelektrophoresetechnologie mit sechzehn Kapillaren. Die Kapillarraylänge beträgt zwischen 22 cm und 80 cm. Außerdem besitzt dieses ein automatisch funktionierendes Polymer-Zuführungssystem und eine Probenkapazität von 96- bis 384-Mikrotiterplatten. Die Probenaufnahme erfolgt bei der Kapillarelektrophorese über eine Injektion, der sogenannten elektrokinetische Injektion. Hierbei wird der Kapillaranfang in das Probengefäß eingeführt. Durch kurze Spannungsintervalle erfolgt die Injektion der Probe. Die Probenmenge ist von der angelegten Spannung und der Zeit abhängig. Es können aber auch andere Probeninjektionsverfahren zum Einsatz kommen, wie etwa die hydrodynamische Injektion, die

Injektion über Vakuum oder durch das Siphon-Prinzip. [Engelhardt et al., 1994; Gey, 2008; Richter, 2003]

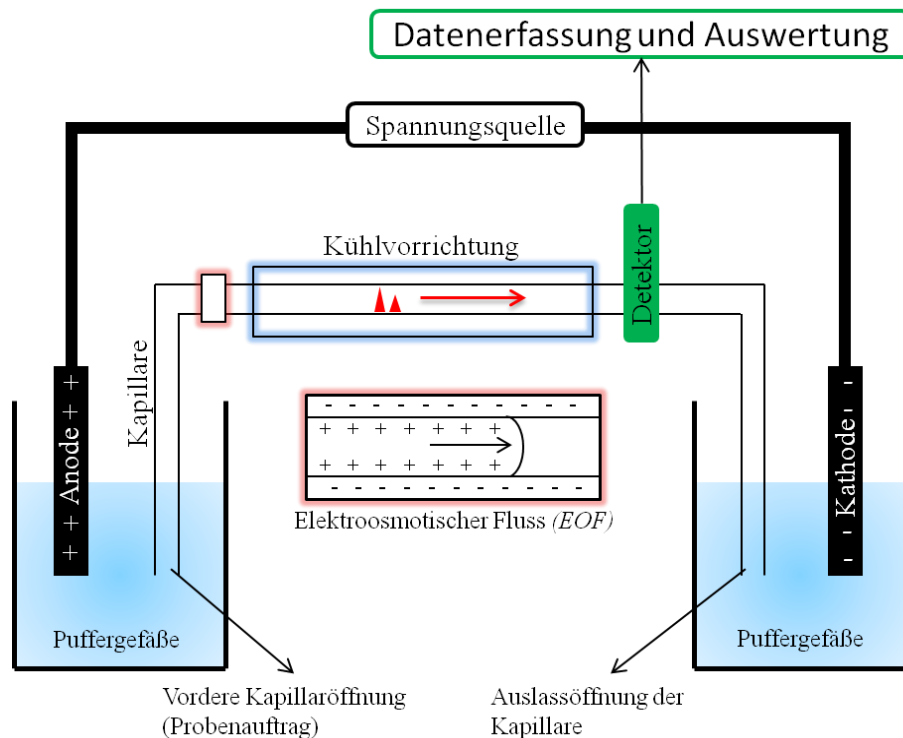


Abbildung 9 Aufbau eines kapillarelektrophoretischen Systems

Der Aufbau einer Kapillarelektrophorese setzt zwei Puffergefäße, zwei Elektroden (Anode und Kathode), eine Spannungsquelle, eine Polymerlösung und eine Kapillare sowie ein Detektionssystem voraus.

Der Probenaufrag erfolgt über die elektrokinetische Injektion. Die elektrophoretische Trennung resultiert aus dem Elektroosmosefluss (EOF). Die Innenwandoberfläche der Kapillare ist negativ geladen und die Flüssigkeitssäule weist eine positive Ladung auf. Durch das Anlegen einer Spannung an die Elektroden kommt es zur Ausbildung eines elektrischen Felds mit Hilfe des flüssigen Elektrolytsystems, sodass der EOF erzeugt wird. Die Wanderung der Probe durch den elektroosmotischen Fluss erfolgt von der Anode zur Kathode aufgrund ihrer positiven Ladung. Die eigentliche Trennung der Moleküle nach deren Größe wird durch eine aus einer flüssigen Matrix bestehenden Polymerlösung erreicht. Ein Laser-Detektionssystem regt die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente mit Fluoreszenzlicht an. Anschließend werden die Signale in Abhängigkeit von der Zeit als Elektropherogramm erfasst und ausgewertet. [Richter, 2003, Misholi, 2010]

In Kooperation mit der Gemeinschaftspraxis für Humangenetik, im Speziellen Herrn PD Dr. Plaschke, wurden die durch die Multiplex-PCR hergestellten Amplifikate in der Kapillarelektrophorese weiteren Untersuchungen unterzogen. Hierzu wurden zunächst Vorbereitungen für die Fragmentanalyse im *3130xl Genetic Analyzer* von *Applied Biosystems* getroffen. Im ersten Schritt wurde eine 1:10-Verdünnung der PCR-Amplifikate angelegt. Als Verdünnungsmittel diente *Hi-Di™ Formamide* von *Applied Biosystems*. Dem schloss sich eine kurze Zentrifugation an. Der zweite Schritt konzentrierte sich auf die Vorbereitungen für den Fragmentlauf. Hier wurden 10 µl *Hi-Di™ Formamide*, 0,5 µl *GeneScan™ 500 Liz* als Größenstandard und 1 µl verdünnte Probe zusammenpipettiert. Es folgte eine kurze Abzentrifugation. Da eine Kapillarelektrophorese nur mit ssDNA arbeiten kann, musste im

dritten Schritt die dsDNA in dem Gemisch in einem Thermocycler für 10 min bei 94 °C denaturiert werden. Im letzten Schritt erfolgte die eigentliche Fragmentanalyse im Sequencer *3130xl Genetic Analyzer* von *Applied Biosystems*. Als Separationsmedium diente *POP-7™ Polymer* und ein Puffer der *EDTA* enthielt. Letzteres ist gleichzeitig ein Anoden- und ein Kathodenpuffer, sodass eine Spannung angelegt werden kann. Die Spannung betrug 15 kV, bei einer Kapillarlänge von 36 cm und einer Laufzeit von 20 min. Über ein Laserdetektionssystem innerhalb des Kapillarelektrophoresegeräts wurden die gelabelten PCR-Amplifikate mit Fluoreszenzlicht angeregt und in einem Elektropherogramm der Größe nach visuell dargestellt. Anschließend wurden die Detektionsergebnisse in das Programm *GeneMapper® Software Version 4.0* importiert und ausgewertet.

3.2.8 Auswertung

Die über das Programm *GeneMapper® Software Version 4.0* gewonnenen Elektropherogramme der 54 Patienten können einen eventuellen Allelverlust im Tumorgewebe aufzeigen. Die Untersuchung kann nur mit heterozygot auftretenden Markern durchgeführt werden. Hier muss eine mathematische Verhältnisrechnung angewendet werden (siehe Kapitel 3.2.8.1), damit der Verlust nicht nur durch Augenmaß, sondern auch rechnerisch bestätigt werden kann. Die Größenbestimmung der dargestellten Peaks in einem Elektropherogramm wird mit Hilfe des Größenstandards (*GeneScan™ 500 Liz*) vorgenommen. Im Folgenden werden die Berechnung eines LOHs, die homozygote und die heterozygote Allelverteilung sowie die Mikrosatelliteninstabilität und die statistische Auswertung näher beschrieben.

3.2.8.1 Berechnung des LOH

Die Auswertung der kapillarelektrophoretisch gewonnenen Elektropherogramme erfolgte rechnerisch nach *Cawkwell et al.* und *Hahn et al.*, für alle Mikrosatellitenmarker die einen informativen Status aufwiesen. Informativ bedeutet, dass die Mikrosatellitensequenzen beider Allele eine unterschiedliche Länge besitzen, sodass deren Größe voneinander unterscheidbar ist. Hierbei muss eine Größendifferenz von mindestens einem Repeat vorhanden sein, damit beide Allele als heterozygot bezeichnet werden können. In der Literatur sind verschiedene rechnerische Ansätze verfügbar. So verwenden beispielsweise *Medintz et al.*, *Paulson et al.* oder *Skotheim et al.* die Peakhöhe als Grundlage für die Beurteilung eines Verlusts [Medintz et al., 2000; Paulson et al., 1999; Skotheim et al., 2001]. Andere konzentrieren sich auf die Peak-Area [Canzian et al., 1996; Cawkwell et al., 1993; Hahn et al., 1999]. Letztere Variante findet in dieser Arbeit ihre Anwendung. Zunächst wurde das Verhältnis von Tumor- und Normalgewebe getrennt berechnet. Hierzu wurde die Peak-Area des „gesunden“ Allels durch den Wert des verloren-gegangenen Allels dividiert. Anschließend wurde aus den beiden Ergebnissen noch

einmal ein Quotient erzeugt. Ein Wert von $>1,5$ deutet auf einen signifikanten Verlust eines Allels im Tumorgewebe hin (Abbildung 10). Marker, die einen nicht-informativen Zustand (homozygot) aufzeigten und Marker, die auf eine Mikrosatelliteninstabilität hindeuteten (siehe Kapitel 3.2.8.4), wurden von der LOH-Analyse ausgeschlossen. Alle kapillarelektrophoretisch gewonnenen Ergebnisse wurden rechnerisch auf ein möglicherweise vorhandenes LOH untersucht. [Cawkwell et al., 1993; Hahn et al., 1999]

$$T = \frac{T_{\text{kept}}}{T_{\text{lost}}} \quad N = \frac{N_{\text{kept}}}{N_{\text{lost}}} \quad \frac{T}{N} > 1,5 \triangleq \text{LOH}$$

Beispiel

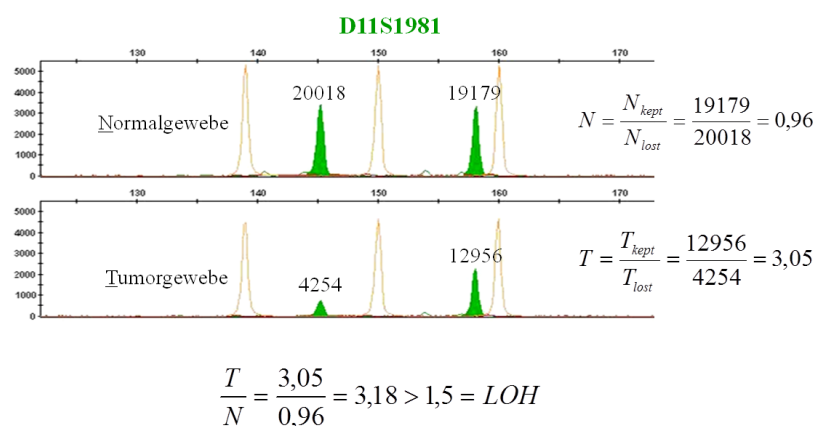


Abbildung 10 LOH-Berechnung nach Cawkwell et al. und Hahn et al.

Die Berechnung des Verlusts wird in dieser Abbildung am Beispiel des Markers D11S1981 des Patienten 479 dargestellt.

Im Tumorgewebe ist die deutliche Reduzierung des ersten Allels zu erkennen. Das lässt vermuten, dass hier ein LOH vorliegen könnte, allerdings muss noch eine rechnerische Bestätigung folgen.

Für die Berechnung des LOHs wurde zunächst die Peak-Area jedes Allels bestimmt. T_{lost} stellt das verlorene und T_{kept} das normale Allel des Tumorgewebes dar. Analog gilt das für das Normalgewebe. Es erfolgt eine Verhältnisrechnung der Peak-Area indem das „gesunde“ Allel durch das verloren gegangene Allel dividiert wird. Anschließend werden beide Verhältnisse noch einmal dividiert. Anhand des resultierenden Quotienten wird ein Wert von $> 1,5$ als LOH bezeichnet. Der orange Peak ist der Größenstandard.

Die Größenbestimmung der dargestellten Peaks in einem Elektropherogramm wird mit Hilfe des Größenstandards (*GeneScan™ 500 Liz*) vorgenommen. Je höher die Peaks eines Allels sind, umso mehr DNA konnte amplifiziert werden. Ein LOH wird durch die Mikrosatellitenmarker detektiert, genau dann wenn die beiden Mikrosatellitenprimer an dem Template nicht binden und Amplifikate durch die PCR erzeugen können, da der zu flankierende Genlocus verloren gegangen ist. Folglich sollte aufgrund der Heterozygotie in dem Elektropherogramm nur ein Peak im Tumorgewebe zu sehen sein, nämlich das gesunde Allel. In der Praxis kann ein totaler Verlust eines Allels normalerweise nicht auftreten, da in den meisten Tumoren immer noch eine bestimmte Menge an Normalzellen vorhanden ist und die Mikrosatellitenprimer an diesen Bereichen binden. Der Peak im Tumorgewebe wird deutlich reduziert dargestellt (Abbildung 10) [Cawkwell et al., 1993].

3.2.8.2 Homozygote Allelverteilung

Eine homozygote Allelverteilung bzw. ein nicht-informativer Zustand tritt auf, wenn die untersuchten Mikrosatelliten die gleiche Länge besitzen und sich durch Überlagerung nicht unterscheiden lassen. Diese Fälle müssen bei der LOH-Analyse ausgeschlossen werden, da nicht beurteilt werden kann, ob ein Allel verloren gegangen ist oder nicht. In Abbildung 11 ist solch ein nicht-informativer Fall des Markers D9S1853 des Patienten 30 dargestellt.

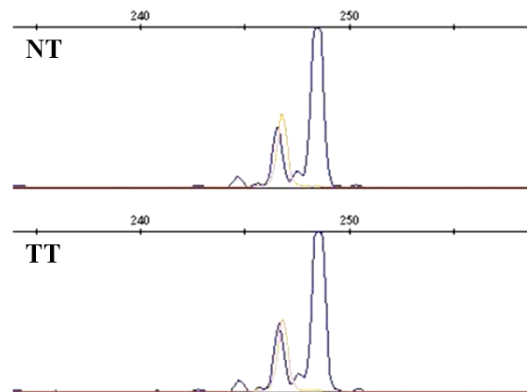


Abbildung 11 homozygote Allelverteilung bei der Mikrosatellitenanalyse

Die Mikrosatelliten beider Allele besitzen die gleiche Länge. Eine LOH-Analyse ist ausgeschlossen, sodass die homozygot auftretenden Marker bei der LOH-Berechnung vernachlässigt werden. Der orange Peak ist der Größenstandard.

3.2.8.3 Heterozygote Allelverteilung

Die heterozygote Allelverteilung bzw. der informative Zustand verkörpert eine unterschiedliche Größe der Mikrosatelliten auf den beiden Allelen. Die Variation in der Anzahl der Repeats in einem Mikrosatelliten entsteht durch DNA-Polymerase-Replikationsfehler. Während der DNA-Replikation bewegt sich die DNA-Polymerase entlang der DNA-Sequenz und vervollständigt diese durch komplementäre Basenpaarung. Wenn das Template stark repetitiv ist, wandert die Polymerase einen vollständigen Repeat vor oder zurück, bevor sie die Replikation fortfährt. Der Verlust oder der Gewinn von einzelnen Wiederholungseinheiten eines Motivs wird auch als „*stepwise mutation process*“ bezeichnet [Levinson & Gutman, 1987]. Replikationsfehler in hoch repetitiven Sequenzen werden demzufolge immer assoziiert mit einer hohen Mutationsrate. Die Unterschiede in der Anzahl der Repeats eines Motivs werden auch als Allele bezeichnet. Ein informativer Zustand beruht folgendermaßen auf einer unterschiedlichen Repeatanzahl beider Allele bedingt durch Replikationsfehler bei der Synthese des komplementären Strangs. Die Markierung der Peak-Area innerhalb der Elektropherogramme wurde in *GeneMapper® Software Version 4.0* vorgenommen. Die Berechnung eines möglichen Allelverlusts erfolgte in *Excel*. In Abbildung 12 ist ein Beispiel dieses informativen Falls der beiden Marker D17S1607 (schwarz) und D9S171 (grün) des Patienten 14 dargestellt.

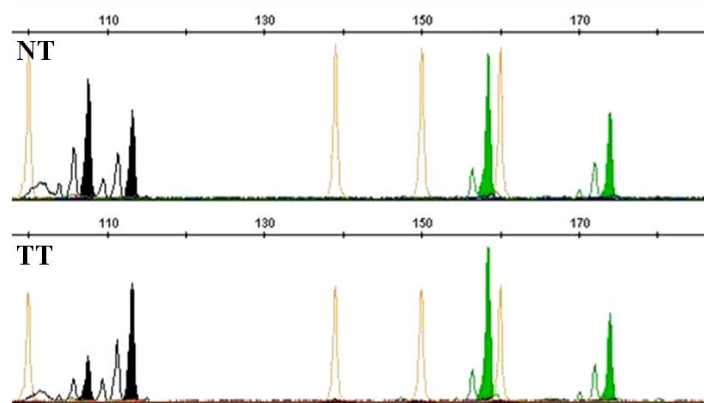


Abbildung 12 heterozygote Allelverteilung bei Mikrosatellitenanalyse

Die Mikrosatelliten der zwei Marker D17S1607 (schwarz) und D9S171 (grün) besitzen eine unterschiedliche Länge und können nach ihrer Größe im Elektropherogramm dargestellt werden. Der orange Peak ist der Größenstandard. Die ausgefüllten Bereich des jeweiligen größten Peaks wurden mittels der Peak-Area ausgewertet. Wenn der Wert über 1,5 liegt, ist ein deutlicher Allelverlust im Tumorgewebe vorhanden. Die kleineren, nicht-ausgefüllten Peaks sind sogenannte Stotterbanden.

Bei der Mikrosatellitenanalyse treten meist vor jedem Hauptpeak kleinere Peaks auf – sogenannte Stotterbanden. Stotterbanden erscheinen mit einer geringeren Intensität bzw. Signalstärke und sind charakterisiert durch verkürzte oder verlängerte Repeateinheiten. Stotterbanden entstehen vermutlich als Folge einer fehlerhaften Arbeitsweise der DNA-Polymerase. Im Speziellen ist die Ursache für das Auftreten von Replikationsfehler das „Schlittern“ der DNA-Polymerase über repetitive Sequenzabschnitte. „Besonders in Bereichen in denen sich ein Nukleotid mehrfach wiederholt [...], kann dies zu einer Deletion oder auch einer Insertion führen, sodass dadurch der Leserahmen verändert wird“ [Graw, 2010; S. 408]. Unter dem in der Literatur bekannten Prozess „*slippage*“ wird diese Art von Replikationsfehler beschrieben. [Graw, 2010]

3.2.8.4 Mikrosatelliteninstabilität

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) äußert sich in einem Elektropherogramm durch einen zusätzlichen Peak im Tumorgewebe. Sie werden durch Mutationen in den repetitiven DNA-Sequenzen als Folge defekter DNA-Reparaturproteine hervorgerufen (siehe Kapitel 2.3.2). In Abbildung 13 ist ein Beispiel dieser MSI des Markers D11S1392 des Patienten 150 dargestellt. Wenn eine MSI im tumorösen Gewebe aufgetreten ist, wurde dieser Zustand für die Auswertung des LOHs nicht berücksichtigt.

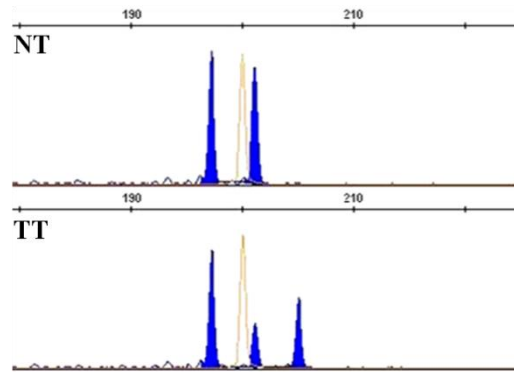


Abbildung 13 Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bei der Mikrosatellitenanalyse

Im Tumorgewebe ist ein zusätzlicher Peak vorzufinden, welcher nur durch eine MSI hervorgerufen werden kann. Eine MSI wurde bei der Auswertung des LOHs nicht berücksichtigt.

3.2.8.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Programm *IBM SPSS Statistics Version 19* von IBM®. Die gewonnenen Daten in Verbindung mit den klinischen Patientendaten werden mit Hilfe des *Chi²-Tests* analysiert. Waren hier die Bedingungen (erwartete Häufigkeit < 5) nicht erfüllt, wurde der *exakte Test nach Fisher* angewendet. Die Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenskurve grafisch dargestellt. Ein Vergleich der Kurven untereinander erfolgt über den *Log-Rank-Test*. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde standardgemäß auf 5 % festgelegt, sodass ein P-Wert von < 0,05 als statistisch signifikant angesehen wurde.

4 Ergebnisse

DNA-Proben von Plattenepithelkarzinomen und dem korrespondierenden Blut von 54 Patienten wurden einer LOH-Analyse unterzogen. Der Verlust von den für die DNA-Reparatur wichtigen Tumorsuppressorgenen Fanc F, Fanc G und Fanc J wurde mit Hilfe der im menschlichen Genom vorkommenden Mikrosatelliten durchgeführt. Geeignete Primersequenzen, die innerhalb der repetitiven Sequenzen binden, wurden über Literaturrecherche detektiert. Sie liegen in der Nähe der zu untersuchenden Genloci. Insgesamt konnten acht Primerpaare ausfindig gemacht werden. Über die Entwicklung einer Multiplex-PCR wurde die DNA der 54 Patienten amplifiziert sowie kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend über die Fluoreszenzmarkierung detektiert.

4.1 Primerinformationsgehalt

Der Informationsgehalt der verwendeten Mikrosatellitenprimer wird nach dem Allelverhalten beurteilt. Dies kann entweder informativ oder nicht-informativ sein. Für die Auswertung eines Allelverlusts können nur die informativen Fälle verwendet werden, da sich dort das Allelverhältnis berechnet lässt (siehe Kapitel 3.2.8.1). Nicht-informative Fälle können nicht beurteilt werden, da sich hier die beiden Allele im Elektropherogramm überlagern und folglich keine Verhältnisberechnung möglich ist. Wie in Abbildung 14 gezeigt, betrugen bei gemeinsamer Betrachtung aller acht Marker die informativen Fälle mindestens 68,5 %. Betrachtet man die untersuchten Genregionen auf dem Chromosom 9, 11 und 17 zusammen, waren von den 53 von 54 Patienten vollständig auswertbar. Ein Patient, Pa 37, zeigte auf dem Chromosom 11 in allen drei Markern (D11S1981, D11S1359 und D11S1392) ein nicht-informatives Verhalten, sodass hier keine Auswertung möglich war. Ansonsten war mindestens ein Marker informativ. Werden die Marker auf dem Chromosom 9 einzeln betrachtet, war D9S1853 zu 68,5 %, D9S171 zu 77,8 % und D9S163 zu 68,5 % informativ. Die Marker D11S1981 mit 85,2 %, D11S1359 mit 75,9 % und D11S1392 mit 79,6 % konnten auf dem Chromosom 11 hinsichtlich ihres informativen Verhaltens ausgewertet werden. Die zwei Marker D17S1855 mit 85,2 % und D17S1607 mit 77,8 % wiesen auf dem Chromosom 17 den informativen Status auf. Den höchsten nicht-informativen Zustand zeigte der Mikrosatellitenmarker D9S163 und D9S1853 mit je 31,5 %.

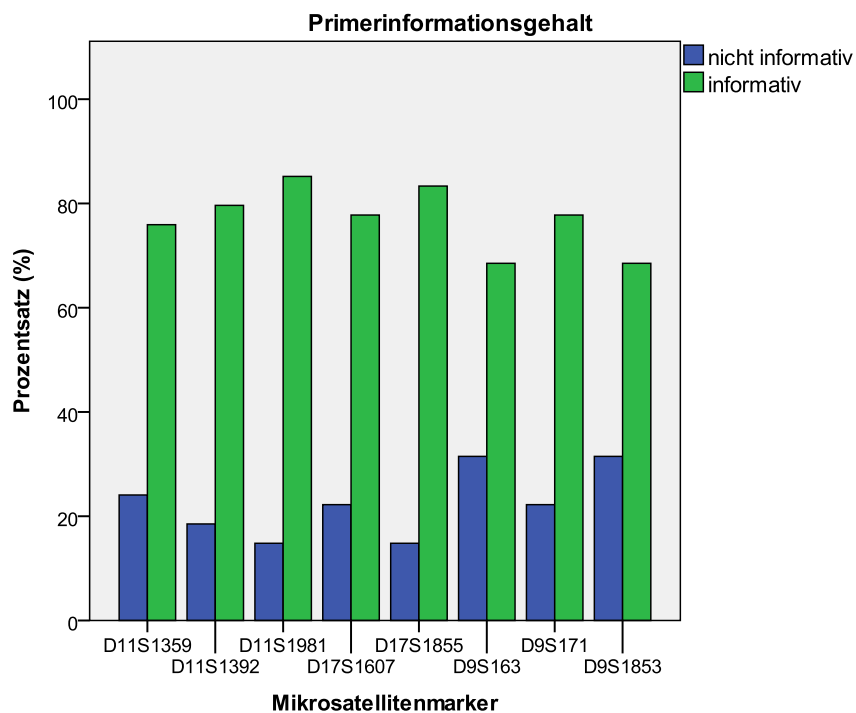


Abbildung 14 Primerinformationsgehalt

Dargestellt ist der Informationsgehalt (in Prozent) aller acht Mikrosatellitenmarker in Bezug auf ein informatives (grün) oder nicht-informatives Verhalten (blau). Werden die Chromosomen 9 und 17 betrachtet, war mindestens ein Marker informativ. Auf dem Chromosom 11 konnte ein Patient (Pa 37) nicht ausgewertet werden, da hier alle drei Marker einen nicht-informativen Zustand aufwiesen.

4.2 Analyse des Patientenkollektivs

Das Ergebnis der LOH-Analyse des untersuchten Patientenkollektivs ist in Tabelle 7 und Tabelle 8 dargestellt. 30 Patienten zeigten in mindestens einem Marker einer chromosomalen Region einen Allelverlust. 23 Patienten zeigten kein LOH an, wobei hier mindestens ein Marker in den drei Genregionen informativ war. Ein Patient (Pa 37) besaß auf dem Chromosom 11 in allen drei Markern einen nicht-informativen Zustand, sodass hier ein Allelverlust nicht beurteilt werden konnte.

Tabelle 7 Ergebnis der LOH-Analyse

„N.i.“ bedeutet „nicht-informativ“, „i.“ bedeutet „informativ“. Eine „MSI“ weist auf eine Mikrosatelliteninstabilität hin. In den Zeilen für die Summe der informativen Fälle und die Summe der LOHs sind jeweils die absoluten und die relativen Häufigkeiten dargestellt. Die Anordnung der Marker in der Tabelle erfolgte analog der Positionsangaben in Abbildung 6.

Nr.	Fanc G			Fanc F			Fanc J	
	D9S171	D9S1853	D9S163	D11S1981	D11S1359	D11S1392	D17S1607	D17S1855
2	LOH	LOH	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.
3	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.
7	LOH	n.i.	LOH	i.	i.	n.i.	i.	i.
14	i.	i.	i.	LOH	LOH	i.	LOH	n.i.
20	i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.
23	i.	LOH	i.	i.	i.	i.	n.i.	i.
26	LOH	n.i.	n.i.	LOH	LOH	LOH	i.	i.
27	i.	i.	i.	n.i.	i.	n.i.	n.i.	i.
30	i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.
37	i.	i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	i.	i.
40	i.	i.	i.	i.	n.i.	i.	n.i.	i.
48	n.i.	LOH	i.	i.	i.	i.	i.	i.
53	LOH	LOH	LOH	i.	i.	i.	n.i.	i.
60	i.	i.	n.i.	i.	i.	i.	n.i.	LOH
101	i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.
107	i.	i.	i.	i.	LOH	LOH	i.	n.i.
114	i.	n.i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	n.i.
116	LOH	n.i.	LOH	n.i.	LOH	n.i.	LOH	i.
117	i.	i.	n.i.	i.	n.i.	i.	n.i.	i.
118	LOH	n.i.	n.i.	i.	n.i.	n.i.	n.i.	i.
120	i.	i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.
121	n.i.	i.	i.	n.i.	n.i.	i.	i.	i.
123	LOH	LOH	i.	n.i.	i.	i.	i.	i.
144	LOH	LOH	i.	i.	i.	i.	i.	i.

Nr.	Fanc G			Fanc F			Fanc J	
	D9S171	D9S1853	D9S163	D11S1981	D11S1359	D11S1392	D17S1607	D17S1855
145	i.	n.i.	LOH	i.	n.i.	i.	i.	n.i.
150	LOH	LOH	LOH	i.	i.	MSI	i.	n.i.
152	i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.	n.i.
154	LOH	LOH	LOH	i.	i.	i.	i.	i.
155	n.i.	i.	n.i.	i.	i.	n.i.	n.i.	LOH
157	n.i.	i.	i.	i.	i.	n.i.	i.	i.
171	i.	n.i.	i.	LOH	LOH	LOH	i.	i.
179	i.	n.i.	i.	i.	n.i.	i.	i.	i.
180	n.i.	i.	n.i.	i.	i.	i.	n.i.	LOH
181	i.	n.i.	n.i.	i.	i.	n.i.	i.	i.
185	i.	i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.
193	n.i.	i.	i.	n.i.	n.i.	LOH	i.	i.
196	i.	i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.
206	i.	i.	i.	n.i.	i.	i.	n.i.	i.
213	i.	i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	n.i.
325	LOH	LOH	LOH	i.	n.i.	i.	i.	i.
326	LOH	n.i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.
328	LOH	n.i.	LOH	i.	n.i.	n.i.	i.	i.
336	i.	i.	i.	i.	n.i.	i.	i.	i.
385	LOH	i.	LOH	i.	i.	i.	i.	i.
386	n.i.	LOH	LOH	i.	n.i.	i.	i.	i.
393	n.i.	n.i.	i.	i.	i.	LOH	i.	i.
401	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.
409	i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.
457	i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.
458	n.i.	LOH	n.i.	n.i.	n.i.	LOH	n.i.	i.
474	LOH	LOH	n.i.	i.	i.	i.	i.	i.
477	n.i.	n.i.	i.	i.	i.	i.	n.i.	i.
478	LOH	n.i.	LOH	i.	i.	i.	LOH	n.i.
479	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	n.i.	i.	MSI
Σ i.	42/54 77,78 %	37/54 68,52 %	37/54 68,52 %	46/54 85,19 %	41/54 75,93 %	44/54 81,48 %	42/54 77,78 %	46/54 85,19 %
Σ LOH	17/42 40,48 %	13/37 35,14 %	12/37 32,43 %	4/46 8,69 %	6/41 14,63 %	6/44 13,64 %	3/42 7,14 %	3/46 6,52 %

Die meisten Verluste sind in der untersuchten Genregion Fanc G auf dem Chromosom 9 zu finden. So detektiert D9S171 mit 40,48 % (17/42), D9S1853 mit 35,14 % (13/37) und D9S163 mit 32,43 % (12/37) ein LOH. Werden nicht die drei Marker getrennt betrachtet, sondern das

Gen Fanc G insgesamt, besitzen 22 von 54 Patienten (40,74 %) einen Verlust in dieser chromosomalen Region. Die drei Mikrosatellitenmarker für das Gen Fanc F D11S1981, D11S1359 und D11S1392 auf dem Chromosom 11 zeigten mit 8,69 % (4/46), 14,63 % (6/41) bzw. 13,64 % (6/44) ein LOH an. In 9 von 53 Patienten (16,98 %) konnte ein Allelverlust von Fanc F, bei Betrachtung aller drei Marker zusammen, nachgewiesen werden. Beim Marker D11S1392 konnte ein Funktionsverlust des DNA-Mismatch-Reparatursystems über die Detektion der Mikrosatelliteninstabilität dokumentiert werden (Pa 150). Die wenigsten Verluste sind in der untersuchten Genregion Fanc J auf dem Chromosom 17 vorzufinden. D17S1607 mit 7,14 % (3/42) und D17S1855 mit 6,52 % (3/46) zeigten nur in insgesamt 6 von 54 Patienten (11,11 %) ein LOH. In Patient 479 wurde in dem Marker D17S1855 eine MSI gefunden.

Der Patient 116 besitzt in allen drei Genen einen Allelverlust (1,85 %). In den Patienten 26, 458 und 479 wurden sowohl in Fanc G als auch in Fanc F ein LOH gefunden (5,56 %). Der Patient 478 besitzt sowohl in Fanc G als auch in Fanc J einen Verlust (1,85 %) und der Patienten 14 in Fanc F und Fanc J (1,85 %).

Tabelle 8 Ergebnis des Allelverlusts bei Betrachtung der drei Genloci

Als Grundlage für diese Tabelle dient Tabelle 7. Hier wurden die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse eines Genlocus zusammengefasst. Das heißt, wenn mindestens ein Marker einen Allelverlust anzeigt, weist der Patienten für das betrachtete Gen ein LOH auf. Das Fragezeichen weist darauf hin, dass alle Marker für die Genregion nicht-informativ waren und demzufolge von der Auswertung ausgeschlossen werden mussten.

Nr.	Fanc G	Fanc F	Fanc J	Nr.	Fanc G	Fanc F	Fanc J	Nr.	Fanc G	Fanc F	Fanc J
2	LOH			117				196			
3				118	LOH			206			
7	LOH			120				213			
14		LOH	LOH	121				325	LOH		
20				123	LOH			326	LOH		
23	LOH			144	LOH			328	LOH		
26	LOH	LOH		145	LOH			336			
27				150	LOH			385	LOH		
30				152				386	LOH		
37		?		154	LOH			393		LOH	
40				155			LOH	401			
48	LOH			157				409			
53	LOH			171		LOH		457			
60			LOH	179				458	LOH	LOH	
101				180			LOH	474	LOH		
107		LOH		181				477			
114				185				478	LOH		LOH
116	LOH	LOH	LOH	193		LOH		479	LOH	LOH	

4.3 Statistische Datenanalyse

Die Daten für die Statistik wurden in Zusammenarbeit mit dem *Regionalen Klinischen Krebsregister Dresden* erhoben. Im Folgenden werden zunächst die klinischen Daten näher beschrieben. Anschließend folgt die Untersuchung im Zusammenhang mit dem LOH-Status (LOH vorhanden oder kein LOH vorhanden). Statistische Analyseverfahren, wie der *Chi²-Test* sowie eine Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, werden für die Auswertung herangezogen.

Zum Zeitpunkt der Auswertung (Juli 2012) waren insgesamt noch 14 Patienten (25,9 %) am Leben, wobei als Beobachtungsbeginn der Operationszeitpunkt (1993 - 2007) festgelegt wurde. Die 5-Jahres-Überlebensrate des untersuchten Patientenkollektivs wurde mit der Kaplan-Meier-Überlebenskurve berechnet. Sie ergab einen Wert von 42,7 %. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve wird durch eine abfallende Treppenfunktion dargestellt. Eine Fallunterscheidung von verschiedenen Gruppen kann vorgenommen werden, beispielsweise Patienten mit einem Allelverlust und Patienten ohne diese genetische Veränderung. Zensierte Daten können bei einer Kaplan-Meier-Kurvenberechnung berücksichtigt werden. In der vorliegenden Arbeit lagen ausschließlich rechtszensierte Daten vor. So wurden nicht-tumorbedingte Todesereignisse oder ein positiver Lebensstatus nach Beendigung der Beobachtung (Zeitpunkt der Auswertung) zensiert. Mehrere Kurven in einem Diagramm wurden über den Log-Rank-Test (zweiseitig) in Hinblick auf eine statistisch signifikante Unterscheidbarkeit analysiert. Die Nullhypothese: „Die Überlebenskurven unterscheiden sich nicht innerhalb der untersuchten Gruppen“ galt es zu widerlegen. Ein P-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen, wenn von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ausgegangen wurde. In diesem Fall wurde nicht die Nullhypothese bestätigt, sondern die Alternativhypothese angenommen.

4.3.1 Analyse der Patientendaten

Die Geschlechterverteilung war innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs mit einem Frauenanteil von 27,8 % und einem Männeranteil von 72,2 % gegeben. Die Altersverteilung der Patienten war zwischen 32 und 86 Jahren. Der Median der 54 Patienten betrug 60 Jahre. Kanzerogene Noxen wie Alkohol konsumierten 35 Patienten (64,8 %) und Nikotin 39 Patient (72,2 %).

Die Verteilung der Tumorstadien war unterschiedlicher stark. So waren 39 (72,2 %) T4-Tumore, 10 (18,5 %) T3-Tumore und 5 (9,3 %) T2-Tumore vertreten. Die Kaplan-Meier-Überlebensrate lieferte kein Indiz für eine signifikant verschlechterte Überlebensrate, wenn das

Tumorstadium bei Diagnose sehr hoch war. So wurde beim Vergleich von T3- und T4-Tumoren ein P-Wert von 0,365 erreicht (siehe Anlage 11).

Wurde eine Überlebenszeitanalyse mit den unterschiedlichen Lymphknotenstadien vorgenommen, war ein deutlicher Unterschied in den Kurven nachweisbar (Abbildung 15). So schien ein N1 oder N2-Stadium keine verschiedenartigen Auswirkungen auf die Überlebenszeit zu haben ($P = 0,927$). Große Unterschiede hingegen waren beim Vergleich von N0 und N1 ($P = 0,034$) oder N0 und N2 ($P = 0,003$) nachweisbar. Die Höhe des Lymphknotenstadiums hatte statistisch belegbar wahrscheinlich einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug bei N0 ca. 71,4 %, bei N1 ca. 30 % und bei N2 etwa 27,3 %.

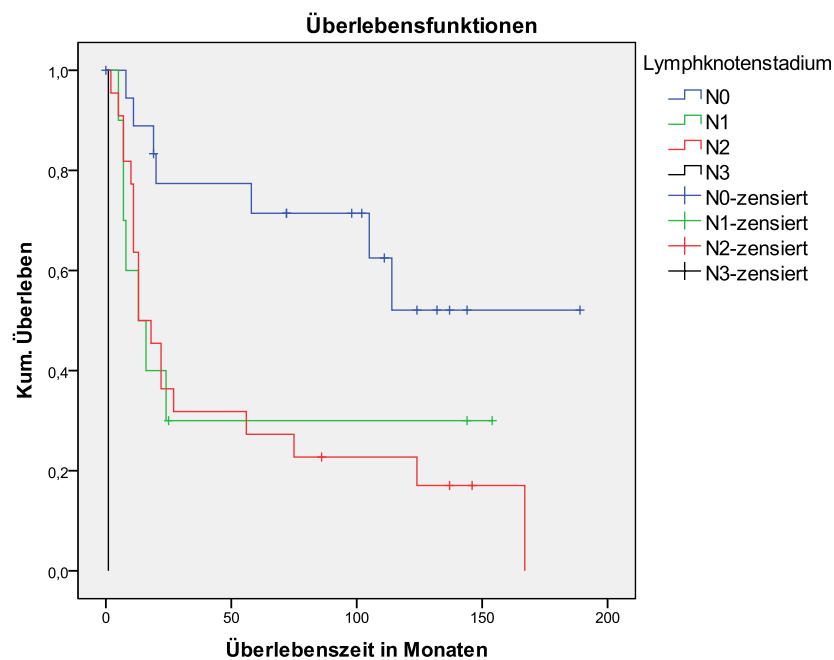


Abbildung 15 Kaplan-Meier-Überlebenskurve beim Vergleich der Lymphknotenstadien

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde eine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,001, sodass die Höhe des Lymphknotenstadiums einen statistisch belegbaren signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit hat.

In 34 Patienten (63 %) waren die Plattenepithelkarzinome mäßig bis schlecht differenziert. Signifikante Überlebenszeitunterschiede zwischen gut und schlecht differenzierten Karzinomen wurden nicht detektiert ($P = 0,188$; siehe Anlage 12).

Eine Resektion hatten 48 Patienten (88,9 %). Bei den restlichen Patienten (6 Patienten (11,1 %)) war eine radikale Entfernung der Neoplasie nicht möglich. Eine Radiotherapie erhielten 49 Patienten (90,7 %), eine Chemotherapie 15 Patienten (27,8 %). Bei Patienten ohne eine Resektion wurde eine Strahlentherapie durchgeführt. Doch schien eine Entfernung des Plattenepithelkarzinoms nach der Erstdiagnose für die Steigerung der Überlebenszeit sehr wichtig zu sein. So überlebte nach Kaplan-Meier kein einziger Patient die 5 Jahre, wenn bei ihm

keine Resektion durchgeführt wurde. Die Bedeutsamkeit einer chirurgischen Karzinomentfernung galt mit einem P-Wert von 0,001 selbst mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 1\%$ als statistisch gesichert (Abbildung 16). Bei 19 Patienten (35,2 %) trat innerhalb des betrachteten Zeitraums ein Rezidiv auf; bei 4 Patienten (7,4 %) metastasierten die Tumore. Eine signifikante Verschlechterung der Überlebenszeit beim Auftreten eines Rezidivs konnte anhand des Log-Rank-Tests nicht nachgewiesen werden ($P = 0,276$; siehe Anlage 10). Dies galt ebenso für die Untersuchung des Metastasenstadiums auf die Überlebenszeit ($P = 0,658$).

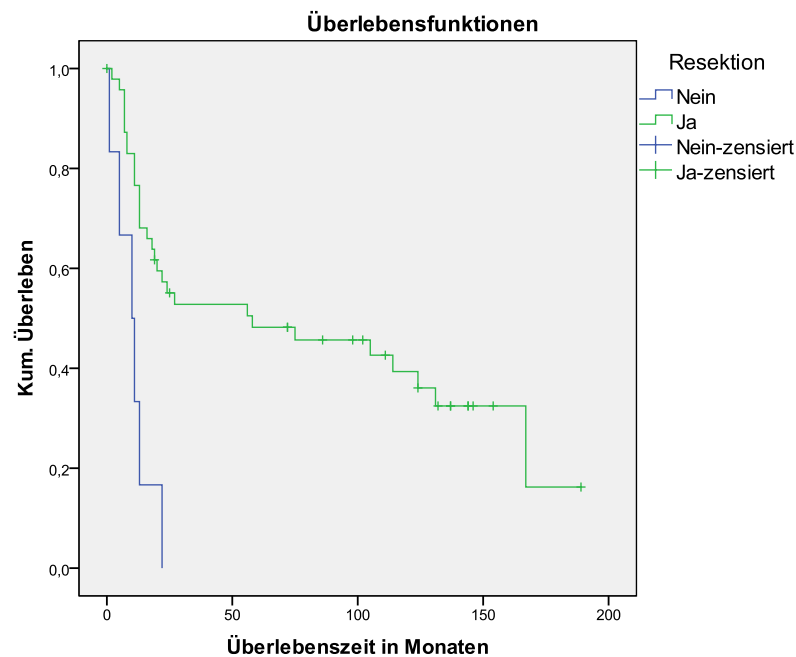


Abbildung 16 Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Patienten mit und ohne Resektion

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde eine signifikante Unterscheidbarkeit der beiden Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,001, sodass eine radikale Entfernung des Karzinoms die Überlebenszeit deutlich steigert.

Zusammenfassend konnte bei der Überlebenszeitanalyse kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht, dem Patientenalter bei Erkrankung, dem Tumorstadium, dem Metastasenstadium, dem Differenzierungsgrad und dem Auftreten eines Rezidivs gefunden werden. Signifikante Assoziationen konnten bei dem Lymphknotenstadium und einer Resektion als Erstbehandlung beobachtet werden.

Im Folgenden erfolgt die statistische Auswertung der LOH-Daten in Verbindung mit den verschiedenen klinischen Patientendaten.

4.3.2 Analyse der LOH-Daten

Im Folgenden wurde die statistische Datenanalyse der Ergebnisse der LOH-Analyse in Zusammenhang mit den klinischen Patientendaten vorgenommen. Hierbei wurden sechs verschiedene Fragestellungen zu jedem einzelnen Marker sowie in Bezug auf die drei Gene aufgegriffen:

1. Gibt es eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem LOH-Status (LOH oder kein LOH) und dem Patientenalter (zwei Gruppen: < 60 Jahre und > 60 Jahre)?
Nullhypothese: Ein bestimmter LOH-Status unterscheidet sich nicht bei Patienten mit einem Erkrankungsalter von < 60 Jahren und bei Patienten mit einem Erkrankungsalter von > 60 Jahren.
2. Gibt es eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem LOH-Status und dem Geschlecht?
Nullhypothese: Es gibt keinen geschlechterspezifischen Unterschied zwischen einem bestimmten LOH-Status.
3. Gibt es eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem LOH Status und dem T-Stadium?
Nullhypothese: Ein bestimmter LOH-Status unterscheidet sich nicht zwischen einer unterschiedlichen Tumorstadienausprägung.
4. Gibt es eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem LOH-Status und dem Alkohol- und Nikotinabusus?
Nullhypothese: Der Missbrauch von Alkohol und Nikotin hat keinen Einfluss auf den LOH-Status der Patienten.
5. Gibt es eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem LOH-Status und dem Rezidivstatus?
Nullhypothese: Das Auftreten eines Rezidivs ist nicht von einem positiven oder negativen LOH-Status abhängig.
6. Gibt es signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit zwischen einem Patienten mit LOH-Entwicklung und einem Patienten ohne LOH-Entwicklung?
Nullhypothese: Die Überlebenszeit der Patienten mit einem positiven LOH unterscheidet sich nicht von Patienten mit einem negativen LOH.

Signifikante Abhängigkeiten (Fragen 1 bis 5) wurden über den Chi²-Unabhängigkeitstest genauer untersucht. Wenn die Bedingungen für einen Chi²-Unabhängigkeitstest nicht erfüllt werden konnten (erwartete Häufigkeit > 5), wurde der exakte Test nach Fisher angewendet. Überlebenszeitanalysen (Frage 6) wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenskurve grafisch dargestellt und über den Log-Rank-Test einer signifikanten Unterscheidbarkeit unterzogen.

4.3.2.1 LOH-Analyse für Fanc G

Im untersuchten Patientenkollektiv konnten auf dem Chromosom 9 die meisten Allelverluste festgestellt werden. Bei 22 Patienten wurde ein positiver LOH-Status in Fanc G nachgewiesen. Im Vergleich zur Gesamtanzahl des Patientenkollektivs betrug der Anteil 40,7 %. Das Patientenalter bei Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms schien keinen Einfluss auf die Ausprägung eines LOH zu haben. Hierbei wurden Patienten über 60 Jahre und Patienten unter 60 Jahre in zwei Gruppen eingeteilt. Die Kreuztabelle ist in Anlage 13 dargestellt. Alle drei Marker lieferten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % kein signifikantes Ergebnis (D9S1853: $P = 0,346$; D9S171: $P = 0,985$; D9S163: $P = 0,414$). Auch bei Betrachtung des Genlocus Fanc G, wenn mindestens ein Marker ein LOH gezeigt hatte, wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt ($P = 0,821$). Das Auftreten des genetischen Verlusts befindet sich bei den unter 60-jährigen und über 60-jährigen Patienten etwa im Gleichgewicht. Jeder Marker gab einen positiven LOH-Status von durchschnittlich ca. 37 % an. Da ein Gleichgewicht zwischen beiden Gruppen herrschte, konnte statistisch keine Abhängigkeit beider Parameter nachgewiesen werden.

Eine statistisch signifikante Verbindung zwischen einem genetischen Allelverlust und dem Geschlecht konnte in keinen der Marker nachgewiesen werden. Alle drei Marker besaßen einen P-Wert von 1,0. Sowohl Männer als auch Frauen waren mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 35 % von einem LOH betroffen (siehe Anlage 14). Bei Betrachtung des Genlocus Fanc G wiesen männliche Patienten mit 46,2 % häufiger einen Allelverlust auf als weibliche Patienten mit 26,7 %. Dies musste aber aufgrund eines P-Werts von 0,192 als statistisch nicht signifikant eingestuft werden.

Eine Assoziation zwischen dem Tumorstadium und dem LOH-Status ergab keine signifikante Abhängigkeit in allen drei Markern (D9S1853 mit $P = 0,528$; D9S171 mit $P = 0,893$ und D9S163 mit $P = 0,299$) sowie im Genlocus Fanc G ($P = 0,384$). Wenn in Fanc G mindestens ein Marker ein LOH gezeigt hatte, besaßen 40 % T2-Tumore, 60 % T3-Tumore und 36 % T4-Tumore einen Allelverlust. So schien es keinen großen genetischen Unterschied zwischen T2- und T4-Tumore bezüglich eines LOH zu geben (siehe Anlage 15).

Der Nikotinmissbrauch von Patienten war nicht assoziierbar mit einem positiven LOH-Befund. Alle drei Mikrosatellitenmarker gaben bei der statistischen Chi²-Analyse einen P-Wert von 1,0 zurück. Demzufolge war das Verhältnis der Ausbildung eines Allelverlusts zwischen nikotinkonsumierenden und nicht-nikotinkonsumierenden Patienten annähernd gleich. Bei Betrachtung des LOH in der chromosomalen Region Fanc G war mit einem P-Wert von 0,608 ebenfalls kein statistischer Zusammenhang zwischen den beiden Parametern zu erkennen. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei dem Parameter Alkohol und einer etwaigen Assoziation mit dem LOH-Status festgestellt werden. Hier zeigten die drei Marker eine statistisch nicht-

signifikante Abhängigkeit (D9S1853: $P = 0,896$; D9S171: $P = 0,292$; D9S163: $P = 0,716$). Bei Fanc G mit einem P-Wert von 0,386 lässt sich ebenfalls kein Zusammenhang erkennen. Demzufolge schien auch hier die Ausbildung eines Allelverlusts nicht mit einem übermäßigen Alkoholkonsum assoziierbar zu sein (siehe Anlage 16).

Eine Assoziation zwischen dem Auftreten eines Rezidivs und einem bestimmten LOH-Status konnte in keinem Marker signifikant nachgewiesen werden (D9S1853: $P = 0,939$; D9S171: $P = 1,0$; D9S163: $P = 1,0$; Fanc G: $P = 0,88$). So bestand annähernd ein Gleichgewicht zwischen einem positivem LOH-Befund und dem nicht-Auftreten bzw. Auftreten eines Rezidivs in jedem betrachteten Marker (siehe Anlage 17).

Der Log-Rank-Test beim Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven bei Patienten mit einem positivem oder negativem LOH-Befund zeigte bei keinen der drei Markern eine statistische Signifikanz (D9S1853: $P = 0,561$ (siehe Anlage 18); D9S171: $P = 0,917$ (siehe Anlage 19); D9S163: $P = 0,490$ (siehe Anlage 20)). Die Überlebenskurve für den Genlocus Fanc G ergab mit $P = 0,898$ ebenfalls kein signifikantes Ergebnis. Folglich schien ein positiver LOH-Befund in Fanc G bei Patienten mit einer Plattenepithelkarzinomausbildung keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit zu haben. Abbildung 17 zeigt ein repräsentatives Beispiel der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse beider Patientengruppen im Genlocus Fanc G.

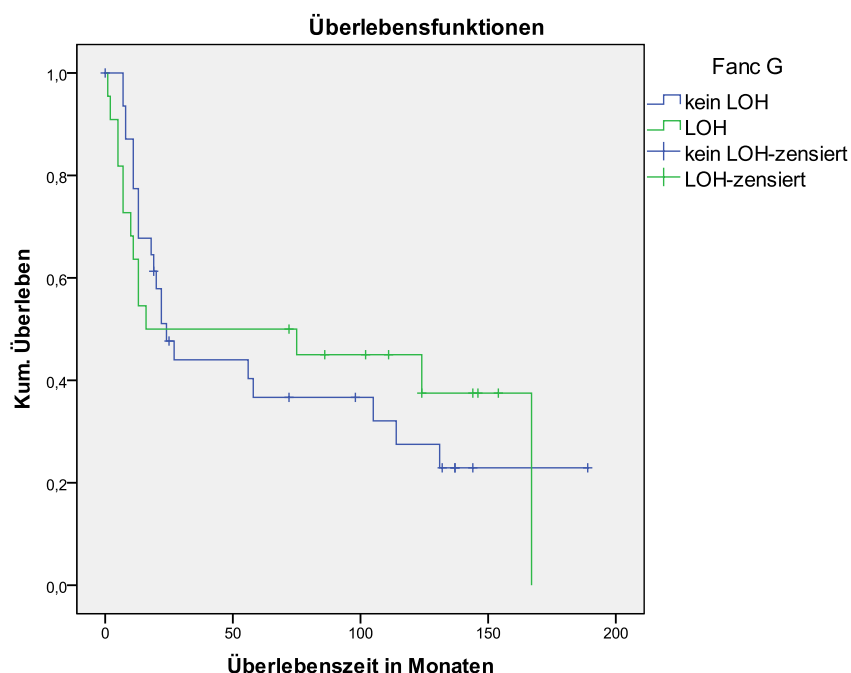


Abbildung 17 Kaplan-Meier-Überlebenskurve beider Patientengruppen für Fanc G

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde keine signifikante Unterscheidbarkeit der beiden Kurven berechnet. Der P-Wert beträgt 0,898. Der LOH-Status hat keinen Einfluss auf das Überleben.

Um die Überlebenszeitanalyse genauer hinsichtlich verschiedener Einflussfaktoren zu untersuchen, wurden das Patientenalter, das Geschlecht und das Tumorstadium zusätzlich zum LOH-Status betrachtet. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass vor allem Patienten mit einem T3-Tumor signifikant länger bei einer LOH-Detektion durch den Marker D9S163 ($P = 0,018$) überleben. Dieser besondere Zusammenhang konnte auch bei dem LOH-Nachweis im Gen *Fanc G* ($P = 0,01$) festgestellt werden (siehe Anlage 21). Ein leichter Trend ließ sich in der Hinsicht erkennen, dass überraschenderweise Patienten mit einem positiven LOH-Befund eine leicht bessere Überlebensrate aufwiesen, als Patienten ohne einen Allelverlust.

Ein kleiner Überblick über die statistisch signifikanten Ergebnisse in Bezug auf die chromosomale Region *Fanc G* ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9 Übersicht über die statistischen Auswertung für das Chromosom 9

In den meisten Fällen wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem positivem LOH-Befund und den spezifischen Parametern gefunden. Wurde die Überlebenszeit (ÜZ) mit dem LOH-Status und dem Faktor Tumorstadium miteinander korreliert, konnte ein statistisch signifikantes Ergebnis in D9S163 und dem Gen *Fanc G* gefunden werden. In beiden Fällen überlebten Patienten mit einem positiver LOH-Befund in T3-Tumoren länger, als Patienten ohne ein LOH.

	<i>LOH</i>	<i>Patienten- alter</i>	<i>Ge- schlecht</i>	<i>Tumor- stadium</i>	<i>Alkohol- abusus</i>	<i>Nikotin- abusus</i>
<i>D9S171</i>	17/42	-	-	-	-	-
<i>D9S1853</i>	13/37	-	-	-	-	-
<i>D9S163</i>	12/37	-	-	-	-	-
<i>Fanc G</i>	22/54	-	-	-	-	-

	<i>LOH</i>	<i>Rezidiv</i>	<i>ÜZ</i>	<i>ÜZ + Patienten- alter</i>	<i>ÜZ + Ge- schlecht</i>	<i>ÜZ + Tumor- stadium</i>
<i>D9S171</i>	17/42	-	-	-	-	-
<i>D9S1853</i>	13/37	-	-	-	-	-
<i>D9S163</i>	12/37	-	-	-	-	$P = 0,018$
<i>Fanc G</i>	22/54	-	-	-	-	$P = 0,010$

4.3.2.2 LOH-Analyse für Fanc F

Der Genlocus Fanc F auf dem Chromosom 11 wies einen Allelverlust in 9 Patienten (16,98 %) auf (Tabelle 8), wenn in mindestens einer der drei Marker (D11S1981, D11S1359 und D11S1392) ein LOH nachgewiesen werden konnte.

Das Patientenalter hatte keinerlei Einfluss auf einen genetischen Allelverlust. So war mit einem P-Wert von 1,0 in D11S1359 und D11S1392 keine statistische Signifikanz nachweisbar. Dasselbe Ergebnis lieferte auch der Marker D11S1981 mit $P = 0,608$. Die gemeinsame Betrachtung der drei Marker in Fanc F ergab mit $P = 0,728$ keine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Patientenalter und dem LOH-Status. Einen positiven LOH-Befund hatten in der Erkrankungsgruppe < 60 Jahre im Mittel 13,5 % Patienten; bei den über 60-jährigen Patienten besaßen durchschnittlich 13,7 % Patienten diesen genetischen Verlust. Demzufolge bestand in etwa ein Gleichgewicht zwischen dem LOH-Status und dem Erkrankungsalter (siehe Anlage 22).

Ein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und Patienten mit und ohne LOH-Ausbildung konnte in allen drei Markern des Chromosoms 11 (D11S1981: $P = 0,313$; D11S1359: $P = 0,309$; D11S1392: $P = 1,0$) statistisch nicht nachgewiesen werden. Ein Verlust in Fanc F stand ebenfalls nicht in Verbindung mit dem Geschlecht ($P = 1,0$). Interessanterweise hatten bei den Mikrosatellitenmarkern D11S1981 und D11S1359 nur männliche Patienten einen Allelverlust; bei weiblichen Patienten war kein LOH nachweisbar. In D11S1392 besaßen 2 Patientinnen (16,7 %) einen chromosomalen Verlust in dieser Region. Alles in allem ist die Wahrscheinlichkeit, dass sowohl Männer als auch Frauen ein LOH in Fanc F ausbilden gleich hoch mit durchschnittlich etwa 16 % (siehe Anlage 23).

Auf dem Chromosom 11 konnte keine signifikante Korrelation beim Vergleich des Tumorstadiums mit dem LOH-Status dokumentiert werden (D11S1981: $P = 0,350$; D11S1359: $P = 0,542$; D11S1392: $P = 0,393$; Fanc F: $P = 0,935$). Interessanterweise war kein positiver LOH-Befund in den Markern D11S1981 und D11S1359 bei T3-Tumoren nachweisbar. D11S1392 detektierte in Karzinomen mit dem Stadium T3 zwei genetische Verluste (28,6 %). Alle Tumorstadien waren in Fanc F im Mittel mit 19 % gleich häufig von einem Allelverlust betroffen (siehe Anlage 24).

Der Nikotinmissbrauch von Patienten war nicht assoziierbar mit einem positiven LOH-Befund. Bei allen drei Mikrosatellitenmarkern war das statistische Ergebnis nicht signifikant mit einem P-Wert von 1,0. In dem Genlocus Fanc F, wenn mindestens ein Marker ein LOH zeigte, konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($P = 0,684$) zwischen beiden Parametern festgestellt werden. Demzufolge bestand ein Gleichgewicht zwischen einem Allelverlust und nikotinkonsumierenden bzw. nicht-nikotinkonsumierenden Patienten. Der Alkoholmissbrauch stand ebenfalls nicht in Verbindung mit dem LOH-Status. So war bei allen drei Markern keine

Signifikanz nachweisbar (D11S1981: $P = 1,0$; D11S1359: $P = 1,0$; D11S1392: $P = 0,645$). In Fanc F herrschte ein Gleichgewicht ($P = 1,0$) zwischen einem positivem LOH-Befund und alkoholkonsumierenden (16,7 %) bzw. nicht-alkohol-konsumierenden Patienten (17,1 %). Demzufolge schien der LOH-Status nicht mit einem Nikotin- bzw. Alkoholmissbrauch assoziierbar zu sein (siehe Anlage 25).

Eine Assoziation zwischen dem Auftreten eines Rezidivs und einem bestimmten LOH-Status konnte in keinem Marker signifikant nachgewiesen werden (D11S1981: $P = 0,587$; D11S1359: $P = 0,069$; D11S1392: $P = 0,645$; Fanc G: $P = 0,469$). So existierte annähernd ein Gleichgewicht zwischen einem positivem LOH-Befund und dem nicht-Auftreten bzw. Auftreten eines Rezidivs. Trotzdem bestand zumindest bei dem Marker D11S1359 die Tendenz einer möglichen Abhängigkeit beider Parameter zueinander. Hier waren vorwiegend Tumore von einem Allelverlust betroffen, bei denen anschließend ein Rezidiv aufgetreten war (30,8 %). Dem gegenübergestellt besaßen 92,9 % der Plattenepithelkarzinome kein LOH, bei denen in Nachbeobachtungen auch kein Rezidiv aufgetreten war. Diese Beobachtung beschreibt nur eine Tendenz, da mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % und einem P-Wert von 0,069 das Ergebnis als statistisch nicht-signifikant eingestuft werden musste (siehe Anlage 26).

Der Log-Rank-Test beim Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven sowohl zwischen Patienten mit und ohne LOH ergab bei dem Marker D11S1359 mit $P = 0,019$ überraschenderweise eine Signifikanz (siehe Anlage 28). Insbesondere besaßen Patienten mit einem Allelverlust in dieser chromosomalen Region eine deutlich schlechtere Überlebensrate als vergleichbare Patienten ohne diese genetische Veränderung. Der Marker D11S1392 mit $P = 0,054$ zeigte eine Tendenz der statistischen Unterscheidbarkeit der beiden Kurven an (siehe Anlage 29). Auch hier war der Trend vorhanden, dass Patienten ohne Allelverlust länger leben, als Patienten mit einem LOH. Dieser besondere Zusammenhang musste aber aufgrund einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % als nicht-signifikant eingestuft werden. Der Marker D11S1981 mit $P = 0,164$ lieferte kein Indiz für eine signifikante Abhängigkeit zwischen der Überlebenszeit und dem LOH-Status der Patienten (siehe Anlage 27). Der Log-Rank-Test bei Betrachtung des Genlocus Fanc F ergab für beide Patientengruppen einen signifikanten P-Wert von 0,011. In Abbildung 18 sind die unterschiedlich verlaufenden Überlebenskurven deutlich zu erkennen. Patienten mit einem LOH in diesem Gen erlagen signifikant früher der Erkrankung als die Vergleichsgruppe ohne Allelverlust. Interessanterweise lieferte der P-Wert die Tendenz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von nur 1 % als signifikant zu gelten.

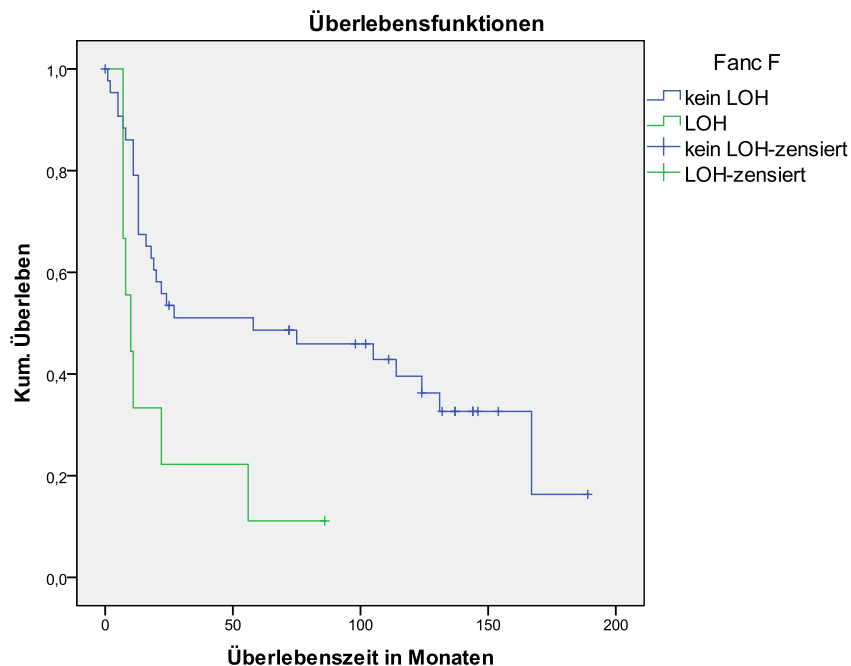


Abbildung 18 Kaplan-Meier-Überlebenskurve beider Patientengruppen für Fanc F

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde eine signifikante Unterscheidbarkeit der beiden Kurven berechnet. Der P-Wert beträgt 0,011. Der Einfluss eines Allelverlusts hat eine negative Auswirkung auf die Überlebenszeit.

Wurde die Überlebenszeit nach Kaplan-Meier genauer hinsichtlich verschiedener Einflussfaktoren, wie etwa dem Patientenalter, dem Geschlecht oder dem Tumorstadium, zusätzlich zum LOH-Status untersucht, konnten mehrere statistisch signifikante Ergebnisse festgestellt werden. So besaßen alle Patienten mit einem Erkrankungsalter über 60 Jahren eine signifikant schlechtere Überlebenszeit, wenn sie einen Allelverlust aufwiesen, als unter 60-jährige Patienten. Diese Beobachtung traf auf die LOH-Detektion in allen drei Markern (D11S1981: $P = 0,007$; D11S1359: $P = 0,007$; D11S1392: $P = 0,003$) und in dem Gen Fanc F ($P = 0,000$) zu. Geschlechtliche Unterschiede waren bei dem Marker D11S1392 und D11S1359 zu vorhanden. Der Erstgenannte wies ein signifikantes Ergebnis bei Frauen auf ($P = 0,021$), der Zweigenannte bei Männern ($P = 0,01$). In jedem Fall war bei dem Auftreten eines Allelverlusts eine verschlechterte Überlebensrate zu erkennen. In Fanc F waren keine geschlechter-spezifischer Unterschied zu erkennen. Die Überlebenszeitanalyse ergab außerdem das signifikante Ergebnis, dass hauptsächlich Patienten mit einem T4-Tumor und einem Allelverlust ein geringeres Überleben besitzen. Diese Aussage trifft für alle Marker außer D11S1981 zu (D11S1359: $P = 0,46$; D11S1392: $P = 0,004$). In Fanc F konnte das Resultat mit einem P-Wert von 0,006 wahrscheinlich bestätigt werden. Eine kurze Zusammenfassung der statistisch signifikanten Ergebnisse wird in Tabelle 10 gegeben.

Tabelle 10 Übersicht über die statistischen Auswertung für das Chromosom 11

Ein signifikant negativer Einfluss eines LOH in der chromosomalen Region Fanc G auf die Überlebenszeit (ÜZ) konnte nachgewiesen werden. Bei der Überlebenszeitanalyse mit dem Faktor Patientenalter wurde immer ein statistisch signifikanter Zusammenhang eines positiven LOH-Befundes in über 60-jährigen Patienten gefunden. Eine verschlechterte Überlebensrate mit einem positiven LOH-Befund wurde signifikant in D11S1359 bei Frauen und in D11S1302 bei Männer entdeckt. Die Überlebenszeitanalyse lieferte hauptsächlich bei Patienten mit einem T4-Tumor und einem LOH eine signifikant schlechtere Überlebenszeit.

	<i>LOH</i>	<i>Patienten- alter</i>	<i>Ge- schlecht</i>	<i>Tumor- stadium</i>	<i>Alkohol- abusus</i>	<i>Nikotin- abusus</i>
<i>D11S1981</i>	4/46	-	-	-	-	-
<i>D11S1359</i>	6/41	-	-	-	-	-
<i>D11S1392</i>	6/44	-	-	-	-	-
<i>Fanc F</i>	9/53	-	-	-	-	-

	<i>LOH</i>	<i>Rezidiv</i>	<i>ÜZ</i>	<i>ÜZ + Patienten- alter</i>	<i>ÜZ + Ge- schlecht</i>	<i>ÜZ + Tumor- stadium</i>
<i>D11S1981</i>	4/46	-	-	P = 0,007	-	-
<i>D11S1359</i>	6/41	-	P = 0,019	P = 0,007	P = 0,021	P = 0,460
<i>D11S1392</i>	6/44	-	-	P = 0,004	P = 0,010	P = 0,005
<i>Fanc F</i>	9/53	-	P = 0,014	P = 0,001	-	P = 0,009

4.3.2.3 LOH-Analyse für Fanc J

In genau sechs Patienten konnte ein positiver LOH-Status in dem Genlocus Fanc J nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Gesamtanzahl des Patientenkollektivs betrug der Anteil nur 11,1 %.

Eine statistische Abhängigkeit zwischen dem Patientenalter und dem LOH-Status konnte in keinem der zwei Marker (D17S1855: P = 0,099; D17S1607: P = 0,242) und bei Betrachtung des Gens Fanc J dokumentiert werden (Fanc J: P = 1,0). Die beiden Marker hatten hierbei eine genau entgegengesetzte Wirkung. So war in D17S1855 kein LOH bei den über 60-jährigen Patienten vorzufinden, mit D17S1607 bei den unter 60-jährigen. Bei Betrachtung des Genlocus Fanc J war von diesem Trend nichts mehr zu erkennen. Hier war das Auftreten eines LOH in beiden Altersgruppen etwa 11 % (siehe Anlage 30).

Ein geschlechterspezifischer Zusammenhang zwischen dem LOH-Status war nicht zu erkennen. So betrug der P-Wert bei den beiden Mikrosatellitenmarkern und dem Genlocus Fanc J 1,0. Die Ausbildung eines LOH in männlichen und weiblichen Patienten war immer ausgeglichen. In Fanc J bilden 13,3 % Frauen und 10,3 % ein LOH aus (siehe Anlage 31).

Eine Assoziation zwischen dem Tumorstadium und dem LOH-Status konnte statistisch nicht bestätigt werden (D17S1855: P = 0,564; D17S1607: P = 0,765; Fanc J: P = 0,686). Interessanterweise wiesen Karzinome des Stadiums T2 keinen Allelverlust in den beiden Markern auf. In T3-Tumoren wurde in D17S1855 ebenfalls kein LOH gefunden, in D17S1607

wies ein Patienten (10 %) einen Allelverlust auf. Bei Betrachtung von Fanc J waren fünf Patient (12,8 %) mit einem T4-Tumor von einem Allelverlust betroffen, 1 Patienten (10 %) mit einem T3-Tumor und kein Patient mit einem T2-Tumor. Dieses Ergebnis musste aufgrund eines P-Wertes von 0,686 aber als statistisch nicht-signifikant eingestuft werden (siehe Anlage 32).

Der Nikotinmissbrauch von Patienten war nicht assoziierbar mit dem LOH-Befund. Der LOH-Status der Marker D17S1855 mit $P = 0,170$ und D17S1607 mit $P = 1,0$ konnte nicht mit nikotinkonsumierenden Patienten assoziiert werden. Dies galt ebenfalls für den Genlocus Fanc J mit einem P-Wert von 0,323. Bei Betrachtung des Alkoholmissbrauchs war überraschenderweise ein signifikanter Zusammenhang mit dem Marker D17S1855 ($P = 0,027$) wahrscheinlich nachweisbar. Insbesondere alkoholkonsumierende Patienten besaßen keinen Allelverlust. Drei Patienten (23,1 %), die nicht regelmäßig Alkohol zu sich nahmen, wiesen in diesem Marker einen Verlust auf. In dem Marker D17S1607 wurde in beiden Patientengruppen ein LOH detektiert. Im Genlocus Fanc J konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis erfasst werden ($P = 0,164$) (siehe Anlage 33).

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Rezidivs und einem bestimmten LOH-Status konnte in keinem der beiden Marker signifikant nachgewiesen werden (D17S1855: $P = 0,547$; D17S1607: $P = 0,546$). Im Speziellen wurde im Marker D17S1607 bei einem Rezidivaufreten kein Allelverlust detektiert. Im Marker D17S1855 besaßen zwei Patienten (12,5 %) ein LOH. Auf dem Genlocus Fanc J ergab sich ein ausgeglichenes Verhältnis mit einem P-Wert von 1,0 zwischen den beiden Rezidivgruppen (Auftreten eines Rezidivs oder Nicht-Auftreten eines Rezidivs). In jeder Gruppe hatten etwa 11 % der Patienten einen positiven LOH-Befund. Schlussendlich konnte kein Zusammenhang zwischen dem LOH-Status und einem Rezidiv-Auftreten beobachtet werden (siehe Anlage 34).

Der Log-Rank-Test beim Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientengruppen mit und ohne einer LOH-Ausprägung ergab bei keinem Marker keine statistische Signifikanz, sodass die Überlebenskurven in jedem Marker nicht voneinander unterscheidbar waren (D17S1855: $P = 0,906$; D17S1607: $P = 0,889$) (siehe Anlage 35 und Anlage 36). Auch in Bezug auf Fanc J (Abbildung 19) konnte kein bedeutsames Verhalten nachgewiesen werden ($P = 0,955$).

Wurde die Überlebenszeitanalyse genauer hinsichtlich verschiedener Einflussfaktoren, wie etwa dem Patientenalter, dem Geschlecht oder dem Tumorstadium, zusätzlich zum LOH-Status durchgeführt, konnten keinerlei statistisch signifikante Ergebnisse detektiert werden.

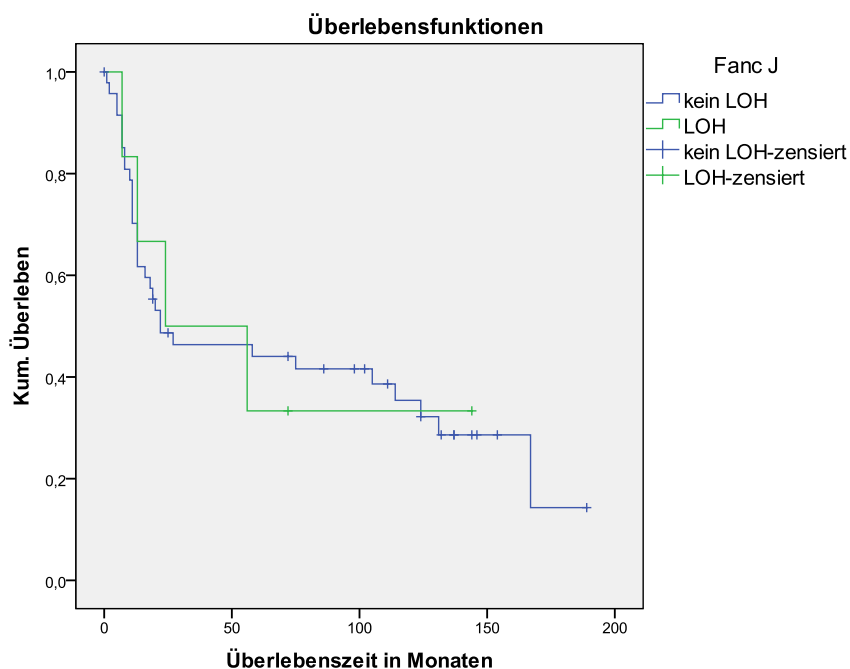


Abbildung 19 Kaplan-Meier-Überlebenskurve beider Patientengruppen für Fanc J

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde keine signifikante Unterscheidbarkeit der beiden Kurven berechnet. Der P-Wert beträgt 0,955.

Ein kleiner Überblick über die statistisch signifikanten Ergebnisse in Bezug auf die chromosomale Region Fanc J ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 Übersicht über die statistischen Auswertung für das Chromosom 17

In den meisten Fällen wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem positivem LOH-Befund und den spezifischen Parametern gefunden. Nur ein übermäßiger Alkoholkonsum stand signifikant mit einem positiven LOH-Befund in dem Mikrosatellitenmarker D17S1855 in Verbindung.

	<i>LOH</i>	<i>Patienten- alter</i>	<i>Ge- schlecht</i>	<i>Tumor- stadium</i>	<i>Alkohol- abusus</i>	<i>Nikotin- abusus</i>
<i>D17S1607</i>	3/42	-	-	-	-	-
<i>D17S1855</i>	3/46	-	-	-	P = 0,027	-
<i>Fanc J</i>	6/54	-	-	-	-	-

	<i>LOH</i>	<i>Rezidiv</i>	<i>ÜZ</i>	<i>ÜZ + Patienten- alter</i>	<i>ÜZ + Ge- schlecht</i>	<i>ÜZ + Tumor- stadium</i>
<i>D17S1607</i>	3/42	-	-	-	-	-
<i>D17S1855</i>	3/46	-	-	-	-	-
<i>Fanc J</i>	6/54	-	-	-	-	-

Zum Schluss wurde die Überlebenszeitanalyse bei Patienten durchgeführt, bei denen in mehr als einem Genlocus ein genetischen Verlust festgestellt werden konnte. Demzufolge wurden Kombinationen eines LOH in Fanc G sowie Fanc J, Fanc G sowie Fanc F und Fanc F sowie Fanc J ausgetestet. Der Log-Rank-Test beim Vergleich der Überlebenskurven ergab kein signifikantes Ergebnis.

Abschließend zu der Ergebnisdarstellung in dieser Arbeit werden noch einmal kurz alle statistisch signifikanten Zusammenhänge zu jeder untersuchten chromosomalen Region aufgezeigt. Auf dem Chromosom 9 konnten keinerlei signifikanten Assoziationen gefunden werden. Trotzdem lagen in Fanc G die meisten gefundenen Allelverluste vor. Hier schien ein positiver LOH-Befund vor allem in Patienten mit einem T3-Tumor die Überlebenszeit signifikant zu verbessern (D9S163: $P = 0,018$; Fanc G: $P = 0,010$) (Tabelle 9). Das Chromosom 11 war in neun Patienten auf dem Gen Fanc F gekennzeichnet durch ein LOH. Hier konnte mit einem positivem LOH-Befund im Marker D11S1359 ein signifikant negativer Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten mit einer Plattenepithelkarzinomentwicklung in der Mundhöhle beobachtet werden ($P = 0,019$). Auch bei einem Allelverlust im Genlocus Fanc F zeigte sich eine bedeutend verschlechterte Überlebensrate ($P = 0,011$). Besonders für über 60-jährige Patienten schien ein LOH sich signifikant negativ auf die Überlebenszeit auszuwirken (D11S1981: $P = 0,007$; D11S1359: $P = 0,007$; D11S1392: $P = 0,004$; Fanc F: $P = 0,001$). Geschlechterspezifisch war dies auch bei Frauen im Marker D11S1359 ($P = 0,021$) und bei Männern im Marker D11S1392 ($P = 0,010$) zu beobachten. Auf dem Chromosom 11 waren hauptsächlich Patienten mit einem T4-Tumor von dem negativen Einfluss eines LOH auf die Überlebenszeit gekennzeichnet (D11S1359: $P = 0,46$; D11S1392: $P = 0,005$; Fanc F: $P = 0,009$) (Tabelle 10). Auf dem Chromosom 17 konnten mit sechs detektierten Allelverlusten im Gen Fanc J die wenigsten Verluste im Bereich dieses Projektes beobachtet werden. Der LOH-Status von D17S1855 konnte dabei mit dem Parameter Alkoholmissbrauch assoziiert werden ($P = 0,027$). Ansonsten waren hier keine weiteren signifikanten Ergebnisse zu beobachten (Tabelle 11).

4.3.3 Mikrosatelliteninstabilität

Eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde in zwei Patienten festgestellt. Hier gab maximal einer der verwendeten acht Mikrosatellitenmarker eine MSI an, sodass es als MSI-L deklariert werden konnte (siehe Kapitel 2.3.2). Ein signifikanter Zusammenhang mit dem Tumorstadium konnte nicht gefunden werden ($P = 0,671$). Auch das Alter ($P = 0,491$) oder das Geschlecht ($P = 0,482$) schien keinen Einfluss zu haben. Bei der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier konnte eine statistisch signifikante Abhängigkeit ($P = 0,005$) zwischen einem Patienten mit einer

MSI-L-Ausbildung und eines Patienten ohne dem Defekt des Mismatchreparatursystems (MMR) festgestellt werden (Abbildung 20).

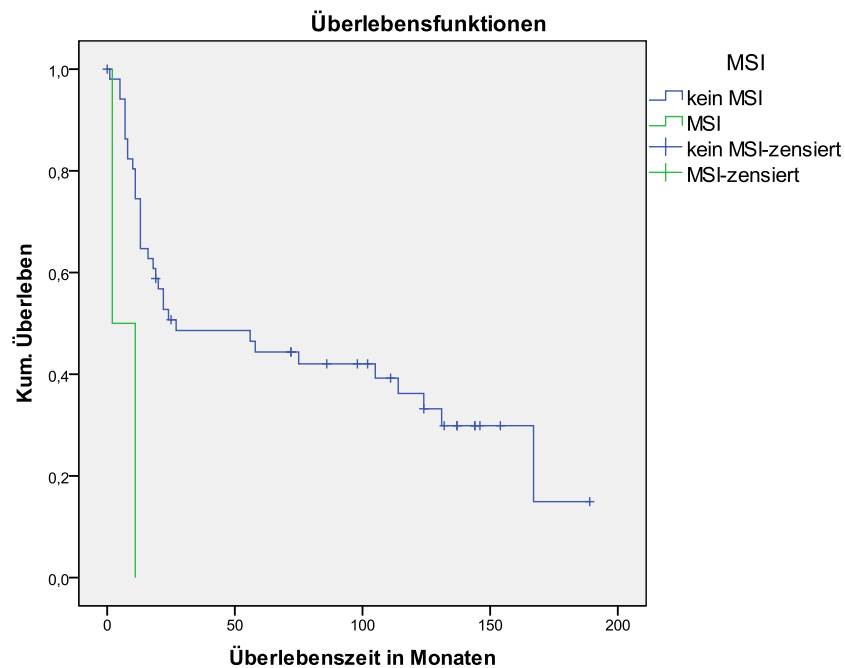


Abbildung 20 Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patientengruppen mit und ohne MSI

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde eine signifikante Unterscheidbarkeit der beiden Kurven berechnet. Der P-Wert beträgt 0,005. Patienten mit einem MSI haben eine deutlich schlechtere Überlebenszeit als vergleichbare Patienten ohne diesen MMR-Defekt.

Im Folgenden werden die unter dem Kapitel 4 beschriebenen Ergebnisse anhand aktueller Studien diskutiert.

5 Diskussion

Aus der Literatur sind Verluste von genetischem Material bereits bei Tumorerkrankungen des Kopf- und Halsbereichs bekannt. Die Gruppe von *Califano et al.* führte als erstes 1996 eine molekularbiologische Untersuchung hinsichtlich eines LOH in verschiedenen Tumorerkrankungsstadien des Kopf- und Halsbereichs durch. Hierzu wurden benigne Läsionen über Karzinome in situ bis hin zu invasiv-auftretenden malignen Karzinomen analysiert [Califano et al., 1996]. Ziel war es, innerhalb den verschiedenen Erkrankungsstadien den genetischen Verlust genauer definieren zu können, indem auftretende genetische Veränderungen und die histopathologische Progression innerhalb der einzelnen prämaligen und malignen Kopf-Hals-Läsionen miteinander korreliert wurden. Als Basis für die Analyse wurden Mikrosatelliten auf den Chromosomen 3p, 4, 6p, 8, 9p21, 11q13, 13q21, 14q und 17p13 ausgewählt. Aufbauend auf den Ergebnissen wurde ein genetisches Progressionsmodell¹⁰ in HNSCC konstruiert. So beschreibt die Arbeitsgruppe von *Califano et al.* den Ablauf des Auftretens eines LOH wie folgt: In der normalen Muskosa führt ein Verlust in 9p, 3p und/oder 17p zur Ausbildung einer Dysplasie. Begründet wurde diese Aussage durch identifizierte genetische Verluste in 9p21 mit 20%, in 3p21 mit 16% und in 17p13 mit 11% innerhalb der untersuchten benignen Läsionen. Wurde bereits ein dysplastisches Gewebe ausgebildet, führt ein Verlust in 11q, 13q und/oder 14q zur Bildung eines Karzinoms in situ. Die Gruppe von *Califano et al.* identifizierte diesbezüglich in den entsprechenden Geweben auf den Chromosomen 11q13 (29 %), 13p21 (32 %) und 14q31 (23 %) ein LOH. Ein Verlust in 6p, 8 und/oder 4q führt letztendlich zur Ausbildung maligner Tumore. In der Studie wird aber auch darauf hingewiesen, dass die Akkumulation solcher genetischer Ereignisse und nicht unbedingt die Reihenfolge die Progression von HNSCC bestimmen [Califano et al., 1996]. So wurden speziell Mikrosatelliten analysiert, die die Funktionsfähigkeit von Tumorsuppressorgenen untersuchen. Auf dem Chromosom 17p beispielsweise ist das Gen p53 lokalisiert, in der chromosomalen Region 9p21 das Gen p16 oder in 11q13 Cyclin D1. Die Arbeitsgruppe von *Califano et al.* war zwar die Erste, die zum genetischen Verlust in Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs ein Progressionsmodell erstellten, doch sind in der Literatur zahlreiche ähnliche Hinweise vorhanden, die ebenfalls molekularbiologische Untersuchungen bezüglich der chromosomalen Verluste in verschiedenen Tumorerkrankungen (z.B. Lungenkrebs, Brustkrebs, Prostatakrebs, etc.) durchführten [Emi et al., 1992; Foulkes et al., 1993; Merlo et al., 1994; Takahashi et al., 1995; Tomlinson et al., 1995; Yee et al., 1994; etc.].

¹⁰ Modell zur Beschreibung der Abfolge der genetischen Veränderungen einer Zelle; Die präneoplastische Zelle erhält durch weitere Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen ihre Malignität

Bei dem Verlust von genetischem Material in bestimmten chromosomalen Regionen ist meist nicht nur ein bestimmtes Gen, sondern eine ganze chromosomale Region mit mehreren Genen betroffen. Demzufolge konzentriert sich die Diskussion der gewonnenen Erkenntnisse über den genetischen Verlust in dieser Arbeit nicht auf den einzelnen Mikrosatellitenmarker, sondern auf die jeweilige chromosomale Region. Zeigte einer der verwendeten Marker ein LOH an (das heißt, lag der errechnete Wert (siehe Anlage 37) über dem Grenzwert von 1,5), ist wahrscheinlich auch die chromosomale Region von einem LOH betroffen. Die Verwendung von mehreren Mikrosatellitenprimerpaaren für die zu untersuchenden Genloci (Abbildung 6) erhöht die Wahrscheinlichkeit ein für die LOH-Analyse gefordertes informatives Verhalten eines Mikrosatelliten in dem Tumor- und Normalgewebe zu erreichen. Die genaue Eingrenzung eines genetischen Verlusts auf dem Chromosom ist mit den in dieser Arbeit verwendeten Mikrosatellitenmarkern nicht möglich. Die eingesetzte Primer-Anzahl ist dafür nicht ausreichend, sodass, für die genauere Eingrenzung des LOH, das gesamte zu untersuchende Chromosom mit Mikrosatellitenmarkern versehen werden muss.

In dieser Arbeit werden mindestens zwei Marker verwendet, die in der Nähe der drei Fanc-Gene binden. Demzufolge können mehrere Marker bei der Berechnung gleichzeitig ein LOH anzeigen. Trotz alledem kann der Fall eintreten, dass ein Mikrosatellitenmarker einen Verlust aufzeigt und ein anderer in dergleichen chromosomalen Region nicht, obwohl dieser einen informativen Zustand aufweist. Zum Beispiel: Im Patient 116 gibt der informative Marker D17S1855 kein LOH an (Wert: 1,32) und D17S1607 liefert knapp den rechnerischen Beweis eines genetischen Verlusts (Wert: 1,52) in der chromosomalen Region um Fanc J (siehe Anlage 37). Dies liegt mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit an den in dem Plattenepithelkarzinomgewebe vorhandenen Normalzellen, sodass in dem Marker D17S1607 des Patienten 116 wahrscheinlich auch ein Verlust vorliegt, dieser aber aufgrund zu vieler Normalzellen im Tumorgewebe rechnerisch nicht bestätigt werden kann. So führen zu viele Normalzellen zu einem erhöhten Allel-Peak im Elektropherogramm, sodass die Detektion eines LOH möglicherweise unerkannt bleibt. Wird beispielsweise die chromosomale Region um Fanc G des Patienten 123 betrachtet, zeigten die beiden Mikrosatellitenmarker D9S171 (Wert: 3,85) und D9S1853 (Wert: 2,36) einen klaren genetischen Verlust an. Interessanterweise lieferte der dritte informative Marker D9S163 (Wert: 1,01) keinerlei Indiz für ein LOH (siehe Anlage 37). Die Position der drei Marker auf dem Chromosom 9 (Abbildung 6) lässt darauf schließen, dass der Verlust nicht so weit in Richtung Zentromer reicht. Dennoch kann in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass die chromosomale Region um Fanc G wahrscheinlich von einem genetischen Verlust betroffen ist. Dies gilt beispielsweise auch für die Patient 48, 144 und 145 bei Betrachtung dergleichen chromosomalen Region.

In der vorliegenden Arbeit konnten in 30 von 54 Patienten (55,56 %) ein Allelverlust in mindestens einer der drei untersuchten chromosomalen Region nachgewiesen werden. Die genetische Veränderung scheint interessanterweise in über der Hälfte der Patienten mit einer HNSCC-Entwicklung in der Mundhöhle vorzukommen. Die gemeinsame Betrachtung der drei Regionen scheint jedoch als nicht sinnvoll, da nur ein Patient (Patient 116) im untersuchten Patientenkollektiv vorhanden war, der in allen drei Regionen ein LOH aufwies (Tabelle 8). Ein positiver LOH-Befund allein in einer der drei untersuchten Gene kann nicht als erhöhtes Risiko für die Ausprägung maligner Läsionen gewertet werden. In Hinblick auf die Evaluierung einer prognostischen Relevanz unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs wird im Folgenden die Diskussion bei getrennter Betrachtung der chromosomalen Regionen vorgenommen.

5.1 Chromosomale Region um Fanc G

Der genetische Verlust in der chromosomalen Region um Fanc G wurde durch drei verschiedene Marker analysiert. Diese Mikrosatellitenmarker flankieren die Region 9p21, 9p21 und 9p13. Die LOH-Frequenz, die mit dem Marker D9S171 untersucht wurde, lag bei 40,48 % (17/42), mit dem Marker D9S1853 bei 35,14 % (13/37) und mit dem Marker D9S163 bei 32,43 % (12/37). Daraus ergab sich ein gesamt LOH-Wert von 40,74 %, welcher in 22 von 54 Patienten für die chromosomale Region um Fanc G festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis kann durch die Studie von *Tripathi et al.* verifiziert werden [Tripathi et al., 2003]. Sie untersuchten Kopf- und Halserkrankungen eines indischen Patientenkollektivs. Die Beschwerden reichten von Läsionen über Dysplasien bis hin zur Ausbildung von Karzinomen. Die Gruppe um *Tripathi et al.* analysierte unter anderem den Chromosomenarm 9p in Hinblick auf einen möglichen genetischen Verlust. Diese Region ist besonders für diese Arbeit interessant, da auf 9p13 das Gen Fanc G kodiert vorliegt. In Korrelation zu den detektierten Ergebnissen bezüglich der chromosomalen Region um Fanc G (LOH-Frequenz: 40,74 %) fanden *Tripathi et al.* sowohl auf dem Chromosomenarm 9p mit 70 % und 9q mit 59 % eine genetische Veränderung. Die höchsten LOH-Frequenzen in Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs waren dabei in den Region 9p24-23 mit bis zu 47 % Verlust zu finden. Die Region 9p22-21 wies mit maximal 31 % ein LOH auf. Bezüglich des Chromosomenarms 9p waren in Dysplasien die meisten Verluste in 9p22-21 mit bis zu 33 % vorzufinden. Nur 10 % des untersuchten Patientenkollektivs besaßen hier in 9p24-23 ein LOH. Die Gruppe von *Tripathi et al.* erörterte, dass der genetische Verlust vor allem in 9p22-21 mit der Entwicklung von dysplastischen Läsionen assoziiert werden kann. Die Detektion eines genetischen Verlusts in der chromosomalen Region um Fanc G in der vorliegenden Arbeit mit 40,74 % liegt etwa 10 % höher als die Ergebnisse von *Tripathi et al.* [Tripathi et al., 2003]. Andere Studien wie etwa von *Califano et al.* oder *van der Riet et al.* beschreiben ebenfalls, dass genetische Verluste in 9p22-21 eine Rolle bei der frühen Progression der Tumorentstehung spielen. Die Untersuchung von *van der Riet et al.* konzentrierte sich hierbei allerdings auf Harnblasenkarzinome und nicht auf HNSCC wie bei *Califano et al.* [Califano et al., 1996; van der Riet et al., 1994]. Auch die Arbeitsgruppe von *El-Naggar et al.* führte hierzu eine Untersuchung des genetischen Verlusts auf insgesamt sieben Chromosomen (3p, 5q, 8p, 9p, 9q, 11q, 17p, 17q, 18p und 18q) durch. Sie analysierten nicht-invasive Läsionen des Kopf- und Halsbereichs sowie invasive Karzinome. In nicht-invasiven Läsionen fanden sie in 9p eine LOH-Frequenz von 28 %. In invasiven Karzinomen war eine LOH-Frequenz von 72 % vorhanden. In Zusammenhang mit den anderen untersuchten Regionen schlussfolgerte die Gruppe von *El-Naggar et al.*, dass ein LOH in den Regionen 8p, 3p, 9q, 11q und 9p an der HNSCC-Tumorgenese beteiligt ist. So sind Alterationen

auf dem Chromosomenarm 9p in der frühzeitigen Entwicklung von HNSCC manifestiert. Da in der vorliegenden Arbeit verschiedene Tumorstadien und keine nicht-invasiven Läsionen (z.B. Leukoplakien) von HNSCC der Mundhöhle untersucht wurden, kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen nötig. Die Arbeitsgruppe von *El-Naggar et al.* fand außerdem Korrelationen zwischen dem genetischen Verlust und einer schlechten Prognose mit klinisch-pathologischen Faktoren [El-Naggar et al., 1995]. In der vorliegenden Arbeit zeigte eine gleichwertige statistische Analyse der LOH-Daten mit klinischen Patientendaten konträre statistisch signifikante Ergebnisse. Überraschenderweise schien ein positiver LOH-Befund in der chromosomalen Region um Fanc G in Patienten mit einem T3-Tumor die Überlebenszeit signifikant zu steigern ($P = 0,010$). Dieses Ergebnis steht im völligen Widerspruch zu den Erkenntnissen von *El-Naggar et al.* [El-Naggar et al., 1995]. Vergleichbare Ergebnisse fand beispielsweise *Ho et al.* in ihrer Studie in primären NSCLC (*non-small cell lung cancer*). Die Patienten mit einem positiven LOH-Befund in 18q21.1 besaßen eine bessere Prognose als entsprechende Patienten ohne LOH [Ho et al., 2002]. Im Gegensatz hierzu können nach *Li et al.* genetische Verluste in HNSCC in mehr als zwei Loci innerhalb der untersuchten chromosomalen Regionen 3p21, 3p25-26, 8pter-21,1, 13q14 und 17p21 mit einer schlechten Prognose assoziiert werden [Li et al., 1994]. Demzufolge sind in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse vorzufinden. Die Erkenntnisse einer verbesserten Prognose bei Patienten mit der Ausbildung eines T3-Tumors sowie eines genetischen Verlusts in Bezug auf die chromosomale Region um Fanc G sollten beispielsweise durch die Ausweitung des Patientenkollektivs gefestigt werden.

5.2 Chromosomale Region um Fanc F

Die genetischen Verluste in der chromosomalen Region um Fanc F wurden durch drei Marker identifiziert. Das in dieser Arbeit untersuchte Gen Fanc F liegt an der Position 11p14.3. Die durch den Marker D11S1981 festgestellte LOH-Frequenz lag bei 8,69 % (4/46), bezüglich des Markers D11S1359 bei 14,63 % (6/41) und im Hinblick auf den Marker D11S1392 bei 13,64 % (6/44). Der Patient 37 musste von der Auswertung ausgeschlossen werden, da kein Marker informativ war. Insgesamt konnte eine LOH-Frequenz von 16,98 % in dieser chromosomalen Region festgestellt werden, welches in 9 von 53 Patienten vorhanden war. Diese LOH-Frequenz liegt deutlich unter den in der Literatur beschriebenen Werten.

In der Studie von *Mondal et al.* wurde wie bei *Tripathi et al.* Karzinome des Kopf- und Halsbereichs eines indischen Patientenkollektivs untersucht. Hier standen allerdings genetische Verluste auf dem Chromosom 11 im Vordergrund. Dieses Chromosom spielt eine entscheidende Rolle nicht nur in HNSCC, sondern auch in zum Beispiel Adenokarzinomen des Magens [Baffa et al., 1996], Brustkebs [Gudmundsson et al., 1995] oder in Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre [Lam et al., 2002], wobei zwei Regionen, eine auf dem kurzen Arm (11p13-15) und eine auf dem langen Arm (11p21-24), besonders für hohe Allelverluste interessant sind [El-Naggar et al., 1996a; Mondal et al., 2003]. In der Studie von *Mondal et al.* konnte eine LOH-Frequenz von 38 % innerhalb der untersuchten Region 11p13-15 festgestellt werden [Mondal et al., 2003]. Auch *El-Naggar et al.* führt eine Untersuchung bezüglich des Allelverlusts auf dem Chromosom 11p in HNSCC durch. Er identifizierte im Locus 11p15 eine LOH-Frequenz von 39,6 %, in 11p13 eine LOH-Frequenz von 29,3 % und in 11p11-12 eine LOH-Frequenz von 18,8 %. Acht Tumore (22,2 %) besaßen sogar ein LOH sowohl in 11p15, als auch in 11p13. Demzufolge konnte in dieser Studie bestätigt werden, dass diese beiden Regionen (11p15 und 11p13) eine Rolle bei der HNSCC-Tumorgenese spielen und Tumorsuppressorgene beherbergen, die an der Progression beteiligt sind [El-Naggar et al., 1996a]. Auch bei anderen Krebserkrankungen, wie etwa in der Niere (Wilms-Tumor) oder in der Blase, wurde von einem genetischen Verlust auf dem Chromosom 11 berichtet [Fearon et al., 1985; Reeve et al., 1989; Schroeder et al., 1987].

Obwohl die in der vorliegenden Arbeit identifizierte LOH-Frequenz deutlich unterhalb der in der Literatur beschriebenen Werten lag, konnte in der statistischen Datenanalyse überraschenderweise zahlreiche signifikante Ergebnisse bei der Überlebenszeitanalyse festgestellt werden. So verfügen Patienten mit einem genetischen Verlust in der chromosomalen Region um Fanc F eine signifikant schlechtere Prognose als vergleichbare Patienten ohne diesen Verlust ($P = 0,014$) (Abbildung 18). Der Zusammenhang zwischen einer schlechten Prognose

und einem Allelverlust in der Region 11p14.3, auf dem das Gen Fanc F kodiert vorliegt, oder innerhalb der in der Umgebung liegenden Chromosomenabschnitte, wie etwa 11p15 oder 11p13, konnte mit anderen HNSCC-Studien nicht untermauert werden. Genetische Verluste auf anderen Chromosomen hingegen, beispielsweise 3p, 9p oder 14q, sind mit einer schlechten Prognose assoziiert [El-Naggar et al., 1995; Matsuura et al., 1999; Pehlivan et al., 2008]. Eine Studie von *Marsit et al.* über die Inaktivierung des Fanc-Gens Fanc F durch eine Methylierung in HNSCC und NSCLC führte zur Erkenntnis, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem vollständigen Funktionsausfall von Fanc F und einer verminderten Überlebenszeit besteht. [Marsit et al., 2004]. Die DNA-Modifikation durch Methylierung an Fanc F hatte demzufolge eine Inaktivierung dieses Tumorsuppressorgens zur Folge [Jones & Laird, 1999]. Die in der vorliegenden Arbeit angewendete Verlustanalyse in dieser chromosomalen Region um Fanc F ist weniger eindeutig als die Ergebnisse von *Marsit et al.* [Marsit et al., 2004]. Ein positiver LOH-Befund innerhalb der Patienten deutet nicht zwangsläufig auf einen Funktionsverlust dieses Gens hin. Hierzu muss zusätzlich zur LOH-Analyse der erste Hit [Knudson, 1971] über eine Mutationsanalyse molekularbiologisch genauer definiert werden, sodass eine Aussage über die Funktionsfähigkeit des Gens getroffen werden kann. Aus dem Kenntnisstand der aktuellen Literatur wird in dieser Arbeit der Zusammenhang eines positiven LOH-Befunds in der chromosomalen Region um Fanc F und einer verschlechterten Prognose in Patienten mit einer Plattenepithelkarzinomentwicklung innerhalb der Mundhöhle zum ersten Mal beschrieben.

Durch die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse mit weiteren Einflussfaktoren, konnte ebenfalls eine negative Auswirkung der Parameter Patientenalter und Tumorstadium auf die Prognose festgestellt werden. Demzufolge besteht ein Zusammenhang zwischen einer verschlechterten Überlebenszeit und dem Erkrankungsalter von über 60 Jahren ($P = 0,001$) sowie dem T4-Stadium ($P = 0,009$). Hierbei scheint es aber als klinisch schlüssig, dass über 60-jährige Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom schneller dieser Erkrankung erliegen als jüngere Patienten. *Carr & Gottschling* beschreiben in einem Review den Einfluss des Alters auf den *Loss of heterozygosity* [Carr & Gottschling, 2008]. Der Review zeigt, dass speziell in Säugetierzellen eine erhöhte Mutationsrate mit fortgeschrittenem Alter dieser Zellen aufgezeigt werden kann, doch eine altersbedingte LOH-Rate nicht eindeutig feststellbar ist. Dem gegenüber stehen Nicht-Säugetier-Modellorganismen, in denen die LOH-Rate in der Tat mit dem Alter in Verbindung gebracht werden kann. *Carr & Gottschling* beschreiben auch einen Rückgang verschiedener Typen von DNA-Reparaturmechanismen mit dem Alter. Eine Veränderung im Mechanismus für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen führt in älteren Zellen zu einer erhöhten LOH-Rate. Das kann bis jetzt in der *Drosophila* und in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden. Alles in allem kann durch den Review von *Carr & Gottschling* die Frage einer altersabhängigen LOH-Raten nicht vollständig beantwortet werden [Carr & Gottschling,

2008]. Aus klinischer Sicht könnte das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, das über 60-jährige Patienten mit einem positiven LOH-Befund eine schlechtere Prognose aufweisen, auch auf einen schwächeren Organismus zurückzuführen sein.

Die in der Literatur beschriebene LOH-Frequenz auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 liegt überraschenderweise deutlich über den in der vorliegenden Arbeit festgestellten LOH-Frequenz in der chromosomalen Region um Fanc F mit 16,98 % [El-Naggar et al., 1996a; Mondal et al., 2003]. Dieser vergleichsweise geringe Prozentsatz kann aus einer *Subpopulation* entsprungen sein. Demzufolge könnten die genetischen Verluste durch die Tumorerheterogenität nur in einem Teil des Tumors nachgewiesen werden. Die Tumorerheterogenität wird durch die Akkumulation von DNA-Anomalien, wie etwa dem LOH, erst während des Tumorstwachstums bestimmt. Mutationen hingegen manifestieren sich bereits in der frühen Tumorentgenese in jeder individuellen Tumorzelle. Maligne Zellen können innerhalb eines Primärtumors heterogen hinsichtlich ihrer sowohl genotypischen als auch phänotypischen Eigenschaften verteilt sein. Folgendermaßen kann eine bestimmte DNA-Anomalie nur in einer Subpopulation der Tumorzellen präsent sein. Hierbei spielen morphologische Aspekte (Zellgröße, Mitoserate, Wachstumsmuster, Anteil nekrotischer Areale, et.) wie auch zeitliche Aspekte eine wichtige Rolle [Korpershoek et al., 2010]. Die Gruppe von *Losi et al.* zeigte, dass bei einer Analyse des Chromosoms 5q und 18q dramatische Heterogenitätsunterschiede in der Verteilung der Allelverluste innerhalb der Tumorzellen vorhanden sind [Losi et al., 2005]. Die Studie von *Ichimura et al.* beschreibt, dass die Existenz von Subpopulationen mit der klonalen Evolution der Tumorzellen steigt. So kann beispielsweise ein Allelverlust nur in einer Subpopulation von Tumorzellen des Primärtumors eine Rolle spielen. Die genetische Veränderung ist dann innerhalb der Tumorstprogression interessant, spielt aber keinerlei Rolle in der Onkogenese [Ichimura et al., 1998]. Letztendlich kann die LOH-Identifizierung aber auch durch die Kontamination des Tumorgewebes mit Normalgewebe gestört worden sein. So kann bei der Mikrosatellitenanalyse lediglich eine Signalabschwächung und kein vollständiger Signalverlust im Sinne eines LOH beobachtet worden sein, sodass ein LOH möglicherweise nicht erfasst wurde.

5.3 Chromosomale Region um Fanc J

Die genetischen Verluste in der chromosomalen Region um Fanc J wurden durch zwei Marker identifiziert. Das in dieser Arbeit untersuchte Gen Fanc J liegt an der Position 17q22. Die durch den Marker D17S1607 festgestellte LOH-Frequenz lag bei 7,14 % (3/42) und bezüglich des Markers D17S1855 bei 6,52 % (3/46). Insgesamt konnte in 11,11 %, also in 6 von 54 Patienten, ein Allelverlust in dieser chromosomalen Region festgestellt werden. Das Chromosom 17 spielt in der Onkogenese eine sehr wichtige Rolle. Auf dem kurzen Arm (p-Arm) ist das Tumorsuppressorgen p53 kodiert, welches in vielen Tumorarten mutiert vorliegt. Das durch dieses Gen produzierte Protein verhindert nach DNA-Schädigung die Zellteilung, sodass die DNA-Reparatur erfolgen kann, um die Defekte zu beheben. Sind die Schäden irreparabel, sorgt p53 dafür, dass die Apoptose eingeleitet wird. In Lungenkrebs beispielsweise ist dieses Gen häufig von einem LOH betroffen. Nur sehr wenig ist über den langen Arm (q-Arm) des Chromosoms 17 bekannt. Das für diese Arbeit wichtige Fanc J ist auf diesem Chromosomenarm (17q22.2) kodiert. Für die chromosomale Region um Fanc J konnte eine LOH-Frequenz von 11,11 % in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Die Gruppe von *Fong et al.* führte eine Studie durch, in der sowohl der p-Arm als auch der q-Arm dieses Chromosoms in NSCLC untersucht worden ist [Fong et al., 1995]. Die genetischen Verluste waren auf 17q mit 42 % deutlich größer als die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Verluste. Sie beschreiben außerdem, dass ein LOH auf 17q häufig beispielsweise in Adenokarzinomen vorkommt, wohingegen bei Plattenepithelkarzinomen ein LOH auf dem p-Arm des Chromosoms 17 häufiger vertreten ist. Ein LOH auf 17q in NSCLC konnte hier mit einem hohen Tumorstadium und einer schlechten Prognose signifikant assoziiert werden [Fong et al., 1995]. Die Erkenntnisse der LOH-Untersuchung innerhalb der vorliegenden Arbeit in der chromosomalen Region um Fanc J standen nicht in Verbindung mit einer schlechten Prognose.

Die in der Literatur nachweisbaren LOH-Frequenzen für den langen Arm des Chromosoms 17 liegen deutlich über den in dieser Arbeit identifizierten Werten. Damit die detektierte LOH-Frequenz als signifikant angesehen werden kann, muss sie oberhalb eines bestimmten „background levels“ liegen. Aus der Literatur ist bekannt, dass das „background level“ eines LOH beim Vergleich des Tumor- und Normalgewebes zwischen 4 % und 20 % schwankt [Cheng & Zhang, 2008; Sudhir, 1998; Wolmand & Heppner, 1992]. Das bedeutet, dass ein LOH zufällig entsteht und demzufolge irrelevant für die Tumorprogression sein kann. Die Detektion des genetischen Verlusts in der chromosomalen Region um Fanc G (siehe Kapitel 5.1) weist mit 40,74 % einen deutlich höheren Wert auf, sodass dieses Ereignis wahrscheinlich nicht zufällig entstanden ist und tatsächlich etwa zwei-fünftel der Patienten an dieser Stelle ein LOH besitzen. *Sudhir* beschreibt, dass eine LOH-Frequenz von über 25 % der informativen

Fälle üblicherweise als signifikant angesehen werden können [Sudhir, 1998]. Die LOH-Frequenz von 11,11 % in der chromosomalen Region um Fanc J liegt eindeutig innerhalb des in der Literatur beschriebenen *background level*. Folgendermaßen kann die Vermutung eines nicht-spezifischen Verlusts aufgrund der chromosomalen Instabilität in Tumorgeweben wahrscheinlich verifiziert werden. Das *background level* kann in verschiedenen Krebsarten unterschiedlich sein. So sind in der Literatur Studien bekannt, beispielsweise von Wolman & Heppner, in denen ein *background level* in Brustkrebs von maximal 4 % beschrieben wird [Wolmand & Heppner, 1992]. Bei Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs konnten keine literarischen Angaben gefunden werden. Letztendlich kann die LOH-Identifizierung in der chromosomalen Region um Fanc J aber auch durch die Kontamination des Tumorgewebes mit Normalgewebe gestört worden sein. Bei den Patienten 26, 53 und 117 ergab die LOH-Berechnung Werte knapp unter dem definierten Grenzwert von 1,5. Demnach kann hier möglicherweise ein LOH vorliegen, aufgrund der geringen Signalabschwächung aber nicht detektiert werden. Die statistisch gewonnenen Erkenntnisse (siehe Kapitel 4.3.2.2) bezüglich der LOH-Frequenz in Fanc J müssen mit Sorgfalt behandelt werden.

Der Wegfall der ordnungsgemäßen Funktionsweise des Gens Fanc J durch Mutationen im FA-Pathway kann durch redundante andere DNA-Reparaturmechanismen, die diese Helikase ersetzen können, möglicherweise ausgeglichen werden (siehe Kapitel 2.4). Können die beiden anderen Gene Fanc G und Fanc F durch zwei Hits an dem gleichen Genlocus nicht mehr exprimiert werden, führt es unter Umständen dazu, dass der Kernkomplex im FA-Pathway nicht mehr vollständig ausgebildet werden kann. Folgendermaßen ist die geordnete Abfolge der DNA-Reparatur nicht mehr möglich, da die Basis, der Kernkomplex (Abbildung 4), fehlt. Ein Funktionsausfall in Fanc J kann aufgrund der Ersetzbarkeit der Helikase durch andere Helikasen, möglicherweise als weniger schwerwiegend eingestuft werden, als ein Funktionsausfall in Fanc F oder Fanc G. Dieser Faktor muss aber durch weiterführende Studien untermauert werden.

5.4 Mikrosatelliteninstabilität

Ein defektes Mismatchreparatursystem (MMR) (siehe Kapitel 2.3.2) in Form einer Mikrosatelliteninstabilität konnte in zwei Patienten detektiert werden. Mit dem Marker D11S1392 in der chromosomalen Region um Fanc F beim Patient 150 und mit dem Marker D17S1855 in der chromosomalen Region um Fanc J beim Patient 479 wurde eine MSI identifiziert. Wenn innerhalb der Patienten maximal ein Mikrosatellitenmarker eine MSI aufzeigte (Tabelle 7), wird das untersuchte Tumorgewebe als MSI-L bezeichnet (siehe Kapitel 2.3.2). Demzufolge konnte in dieser Arbeit in 3,7 %, also 2 von 54 Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ein MSI-L festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt annähernd mit den in der Literatur vorhandenen Erkenntnissen überein. Die dort beschriebenen MSI-Raten in HNSCC schwanken zwischen ca. 2 % und 30 % [Blons et al., 1999; De Schutter et al., 2009; El-Naggar et al., 1996b; Field et al., 1995; Ishwad et al., 1995; Koy et al., 2008; Ng et al., 2000; Piccinin et al., 1998]. Die Arbeitsgruppe von *Koy et al.* detektierte in 8,8 % (8/90) HNSCC eine MSI. Davon wiesen 7 Tumore ein MSI-L und 1 Tumor ein MSI-H auf (siehe Kapitel 2.3.2) [Koy et al., 2008]. *Blons et al.* untersuchten 56 HNSCC bei denen 1,8 %, also 1 Tumor über ein MSI-H verfügte [Blons et al., 1999]. *Piccinin et al.* stellten in HNSCC eine MSI in 7 % (5/67) fest und bei *Ng et al.* war ein MSI-L Phänotyp mit 13 % vertreten [Ng et al., 2000; Piccinin et al., 1998]. In der Studie von *Chakrabarti et al.* wurde ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten MSI-Rate und einer hohen LOH-Frequenz in HNSCC-Tumoren beschrieben. Hierbei wurde über den Einfluss eines Allelverlusts in Kombination mit einer MSI auf die HNSCC-Kanzerogenese berichtet [Chakrabarti et al., 2006]. Diese Erkenntnis kann mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten nicht bestätigt werden. Hier scheint das Auftreten eines MMR-Defekts zufällig zu sein (Tabelle 7). Der geringe Prozentsatz an MSI-L im untersuchten Patientenkollektiv konnte nicht mit klinischen Patientendaten assoziiert werden. *Field et al.* beschrieb einen Zusammenhang zwischen Patienten, die keinen Tabak konsumierten, und dem nicht-Auftreten einer MSI. Eine Korrelation mit anderen Parametern, wie etwa dem Tumorstadium oder dem Alter, konnte entsprechend den Ergebnissen in dieser Arbeit auch nicht nachgewiesen werden [Field et al., 1995]. Ähnliche Ergebnisse fand auch *Piccinin et al.* [Piccinin et al., 1998].

In der Literatur wird oft der Einfluss des Auftretens einer MSI auf die Kanzerogenese untersucht. Ob eine MSI eine Rolle in der Kanzerogenese in HNSCC spielt, ist nach aktuellem Stand der Forschung weitestgehend unklar [De Schutter et al., 2009]. In beispielsweise sporadischen kolorektalen Krebserkrankungen kann das Auftreten einer MSI als prognostischer und prädikativer Marker genutzt werden [Gleich et al., 2003; Popat et al., 2005]. Aufgrund der geringen MSI-Raten im Tumorgewebe, kommen die Forscher häufig zu dem Schluss, dass die

genetischen Instabilitäten resultierend aus MMR-Defekten in der Kanzerogenese von HNSCC eine untergeordnete Rolle spielen [De Schutter et al., 2009; Ng et al., 2000; Piccinin et al., 1998]. Aufgrund der Ergebnisse von 3,7 % MSI-L im hier untersuchten Patientenkollektiv, kann keine gegenteilige Aussage getroffen werden. Die Gruppe von *El-Naggar et al.* untersuchte präinvasive und invasive HNSCC-Läsionen, wobei in Dysplasien mit 15 % und in invasiven Karzinomen mit 30 % eine MSI gefunden wurde. Eine MSI schien hier mit einer steigenden aggressiven klinischen Charakteristik der Läsion in Verbindung zu stehen [El-Naggar et al., 1996b]. Bei der statistischen Datenanalyse konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und dem Auftreten einer MSI festgestellt werden. Demzufolge können die Ergebnisse von *El-Naggar et al.* in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Um die prognostische Relevanz der festgestellten MSI zu prüfen, wurde eine Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (siehe Kapitel 4.3.3) durchgeführt. Hier konnte ein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Ein MSI-L schien mit einer deutlich schlechteren Überlebenszeit in Verbindung zu stehen (Abbildung 20). Die Nutzung der MSI als prognostischer Marker wird bereits beim kolorektalen Karzinom angewendet. Hier haben Patienten mit einem defekten MMR-System eine um 60 % verbesserte Überlebenszeit als vergleichbare Patienten ohne eine MSI [Gleich et al., 2003]. Im Gegensatz dazu unterstützt eine MSI die Progression von Brustkrebs und kann so mit einer schlechten Prognose assoziiert werden [Paulson et al., 1996]. Nach dem derzeitigen Literaturstand sind noch keine Ergebnisse bezüglich der Beurteilung der Prognose von HNSCC-Patienten anhand des Auftretens einer MSI verfügbar. Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass insgesamt 54 verschiedene Tumorgewebe in dieser Arbeit untersucht wurden und ein MSI-L in ausschließlich zwei Patienten festgestellt werden konnte. Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse verifizieren zu können, sollte das Patientenkollektiv vergrößert werden.

5.5 Aussagen zur prognostischen Relevanz

Die Ergebnisdarstellung und die anschließende Diskussion zeigten, dass ein Allelverlust innerhalb der chromosomalen Region um Fanc G am häufigsten in dem untersuchten Patientenkollektiv auftreten. Etwa 41 % aller Patienten waren davon betroffen. Ein positiver Einfluss auf die Überlebenszeit bei Patienten mit einem Allelverlust in dieser chromosomalen Region und einem T3-Tumor konnte gefunden werden. Innerhalb der anderen untersuchten Tumorstadien T2 und T4 konnte allerdings keine signifikante Assoziation mit der Überlebenszeit festgestellt werden. Die prognostische Aussagekraft dieses Ergebnisses ist mit Sorgfalt zu behandeln. So war der Anteil der T3-Tumor mit 10 von 54 Patienten deutlich geringer als der der T4-Tumor mit 39 von 54 Patienten. Obwohl dieses LOH-Ergebnis im untersuchten Patientenkollektiv mit 40,74 % nicht zufällig entstanden sein kann, sollten in Bezug auf eine prognostische Relevanz noch weitere Untersuchungen erfolgen (siehe Kapitel 6). Die Ausweitung des Patientenkollektivs in Bezug auf T3-Tumore sollte hier den ersten Schritt darstellen.

Die Allelverluste innerhalb der chromosomalen Region um Fanc F waren in Bezug auf die statistisch gewonnenen Ergebnisse interessanter. In etwa 17 % der Patienten konnte ein LOH festgestellt werden. Interessanterweise wurde ein negativer Einfluss auf die Überlebenszeit detektiert. Doch aufgrund der Tumorerheterogenität kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser LOH-Detektion um eine Subpopulation handelt. So kann der LOH in dieser chromosomalen Region nur in dem Tumoreareal eine Rolle spielen, aus dem die DNA extrahiert wurde. Ebenso gut können Normalzellen die Ergebnisse der LOH-Auswertung verfälscht haben, sodass nach Definition ein LOH nicht detektiert werden konnte. Der Gedanke, dass es sich bei den detektierten Allelverlusten in der chromosomalen Region um Fanc F nur um ein *background level* handelt, kann ebenfalls nicht vollständig verworfen werden. In Kapitel 5.3 wurde beschrieben, dass das zufällige Entstehen eines LOH zwischen 4 % und 20 % schwanken kann. Die Tatsache, dass kein gewebespezifisches *background level* für HNSCC in der Literatur verfügbar war, lässt nicht vollständig ausschließen, dass die gefundenen 17 % lediglich dem zufälligen Entstehen eines Allelverlusts zugeordnet werden können. Daher empfiehlt es sich zukünftig einzelne Tumorzellen mittels Lasermikrodissektion aus dem Tumorgewebsverband zu gewinnen. Eine prognostische Aussage kann in dieser Arbeit nur mit äußerster Vorsicht getroffen werden. So existiert die Tendenz eines negativen Einflusses eines positiven LOH-Befunds in dieser chromosomalen Region um Fanc F auf die Überlebenszeit. Um die prognostische Relevanz dieses Ergebnisses zu sichern, müssen unbedingt weiterführende Analysen vorgenommen werden (siehe Kapitel 6). Das Potential für die genauere Definition der Überlebenszeit bei Patienten mit einer Plattenepithelkarzinomkrankung in der Mundhöhle ist

bei einem Allelverlust in dieser chromosomalen Region aber gegeben. Weitere Untersuchungen können so potentielle Wege für eine gezieltere therapeutische Intervention für betroffene Patienten öffnen.

Ein Allelverlust in der chromosomalen Region um Fanc J kann für prognostische Zwecke in Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle wahrscheinlich nicht verwendet werden. Mit etwa 11 % detektierten Verlusten ist die Anzahl im untersuchten Patientenkollektiv zu gering. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um zufällig entstandene LOH handelt (*background level*), ist zu hoch. Da auch keine signifikanten Ergebnisse bei der Überlebenszeitanalyse gefunden werden konnten, ist die prognostische Relevanz eines Allelverlusts innerhalb dieser chromosomalen Region um Fanc J äußerst gering.

Alles in Allem scheint sowohl die chromosomale Region um Fanc G als auch um Fanc F vielversprechende Möglichkeiten für eine genauere prognostische Definition der Überlebenszeit bei Patienten mit einer Plattenepithelkarzinomentwicklung in der Mundhöhle zu bieten. Weitere Analysen werden allerdings benötigt, um die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekularbiologische Untersuchung des *loss of heterozygosity* (LOH) in drei Tumorsuppressorgenen der Fanconi Anämie (Fanc G, Fanc F und Fanc J). Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Prüfung einer prognostischen Relevanz dieser Gene, um in Zukunft den Weg für die Entwicklung eines verbesserten kausalen Therapiekonzepts für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle zu ebnen. Kenntnisse über genetische Dispositionen führen möglicherweise zur Steigerung der Prognose für erkrankte Patienten. Die molekularbiologische Untersuchung des LOH wurde an einem Kollektiv bestehend aus 54 Patienten retrospektiv vorgenommen. Entgegen der in der Literatur beschriebenen 5-Jahres-Überlebensrate von 50 % [Forastiere et al., 2001] bei Tumorerkrankungen des Kopf- und Halsbereichs, lag diese in der vorliegenden Arbeit bei 42,7 %. Für die LOH-Analyse wurde extrahierte DNA aus Plattenepithelkarzinomgewebeproben und den korrespondierenden Blutproben verwendet. Mit acht Primerpaaren wurden entsprechend der Mikrosatelliten-Sequenz die zu untersuchenden chromosomalen Bereiche flankiert. Über die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) und der Etablierung einer Multiplex-PCR wurde die DNA der Tumorgewebe und des korrespondierenden Bluts des Patientenkollektivs amplifiziert. Die daraus entstehenden Produkte wurden anschließend kapillarelektrophoretisch einer Fragmentanalyse unterzogen, sodass im weiteren Verlauf mögliche Allelverluste im Tumorgewebe für jeden Patienten rechnerisch identifiziert werden konnte. Eine statistische Auswertung mit der Anwendung des *Chi²-Tests* und der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse ließ im Anschluss mögliche Zusammenhänge zwischen verschiedenen klinischen Parametern (Patientenalter bei Erkrankung, Geschlecht, Tumorstadium oder Auftreten eines Rezidivs) und dem LOH-Status (LOH vorhanden oder kein LOH vorhanden) sowie zwischen der Überlebenszeit und dem LOH-Status erkennen.

Der Zusammenhang zwischen einem Allelverlust und der HNSCC-Tumorprogression wurde in der Literatur bereits beschrieben [Califano et al., 1996]. Das Auftreten eines LOH in einer der drei Gene Fanc G, Fanc F oder Fanc J in Verbindung mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle wurde jedoch bisher noch nicht publiziert. Der Informationsgehalt der eingesetzten Mikrosatellitenprimer war hoch. In 53 von 54 Patienten war mindestens ein Marker informativ. Der Patient 37 musste bei der Auswertung für das Gen Fanc F ausgeschlossen werden, da hier kein Marker informativ war. Der Patient 116 wies in allen drei Regionen einen Verlust auf. In Bezug auf eine mögliche prognostische Relevanz wurden die drei untersuchten Gene jedoch getrennt behandelt.

Das Tumorsuppressorgen Fanc G auf dem Chromosom 9 war am häufigsten von einem Allelverlust im Tumorgewebe betroffen. Etwa 41 % des untersuchten Patientenkollektivs wiesen diese genetische Veränderung auf. Ein Verlust in dieser Region steigerte die Überlebenszeit signifikant in Patienten mit einem T3-Tumor. Ein Allelverlust im Tumorsuppressorgen Fanc F auf dem Chromosom 11 konnte in etwa 17 % des untersuchten Patientenkollektivs nachgewiesen werden. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese LOH-Frequenz möglicherweise aufgrund der Tumorerheterogenität aus einer Subpopulation entstanden ist. So kann der LOH nur in dem untersuchten Tumorareal eine Rolle spielen, aus dem die DNA extrahiert wurde. Der Gedanke, dass es sich bei den festgestellten Allelverlusten in Fanc F nur um ein *background level* handelt, konnte ebenfalls nicht verworfen werden. Dennoch konnte mit Hilfe der statistischen Auswertung ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines LOH und einer schlechteren Überlebenszeit der Patienten festgestellt werden. Das Potential für eine genauere Prognose erkrankter Patienten ist mit der molekulargenetischen Detektion eines Allelverlusts in Fanc F vorhanden, allerdings müssen noch weiterführende Untersuchungen bezüglich der Tumorerheterogenität in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des *background levels* vorgenommen werden. Aufgrund der noch ausstehenden Analysen sollte dieses Ergebnis mit Sorgfalt behandelt werden. Ein Allelverlust im Tumorsuppressorgen Fanc J kann für prognostische Zwecke für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Mit 11 % nachgewiesenen LOH im untersuchten Patientenkollektiv ist die Wahrscheinlichkeit für ein zufälliges Entstehen sehr hoch. Ferner konnten auch keine statistisch signifikanten Ergebnisse mit klinischen Parametern oder der Überlebenszeit aufgespürt werden, sodass eine prognostische Relevanz nahezu ausgeschlossen werden konnte. Das Auftreten einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) konnte in zwei Patienten in Fanc F (Patient 150) und Fanc J (Patient 479) beobachtet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass beispielsweise Patienten mit einer kolorektalen Tumorerkrankung beim Auftreten einer MSI eine um 60 % verbesserte Überlebenszeit haben [Gleich et al., 2003]. In dieser Arbeit konnte eine signifikante Assoziation zwischen einer MSI und einer schlechten Überlebenszeit gefunden werden. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand sind noch keine Ergebnisse bezüglich der Beurteilung der Prognose von HNSCC-Patienten und dem Auftreten einer MSI verfügbar. Möglicherweise kann eine MSI, wie bei kolorektalen Tumorerkrankungen, für prognostische Zwecke verwendet werden. Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass insgesamt 54 verschiedene Tumorgewebe in dieser Arbeit untersucht wurden und ein MSI-L in ausschließlich zwei Patienten festgestellt werden konnte.

Diese Arbeit liefert den Grundstein für die Entwicklung eines neuartigen Therapiekonzepts. Nach weiterführenden Analysen könnte ein LOH in den Genen Fanc G und Fanc F

möglicherweise das Potential besitzen, als prognostischer Marker zu dienen. Auch der Ansatz der Verwendung der Mikrosatelliteninstabilität als prognostischen Marker sollte weiter verfolgt werden. Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse verifizieren zu können, sollte das Patientenkollektiv vergrößert werden. Der Weg für den Einsatz von individuellen Therapiemöglichkeiten wird durch die Identifizierung genetischer Dispositionen womöglich geebnet werden.

7 Ausblick

Auf dem Weg der Entwicklung eines verbesserten Therapiekonzepts für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle liefert die vorliegende Arbeit erst den Grundstein. Weiterführende Untersuchungen sind unbedingt notwendig, um die gewonnenen Erkenntnisse durch die Analyse des chromosomalen Verlusts in den drei Fanc-Genen mit Sicherheit für prognostische Zwecke einsetzen zu können. Klar ist, dass zwischen der Ausbildung eines LOH in eines der untersuchten Fanc-Gene und HNSCC einer Verbindung besteht. Dieser Zusammenhang muss aber noch genauer untersucht werden. Ebenso gut können auch andere Fanc-Gene in den Prozess integriert sein. So scheint es als plausibel, auch andere Fanc-Gene einer LOH-Analyse in HNSCC zu unterziehen. Um die prognostische Relevanz der Gene Fanc G und Fanc F in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen genauer zu definieren, ist eine Erweiterung des Patientenkollektivs notwendig. Ein LOH liefert zwar das Indiz für den Ausfall eines Tumorsuppressorgens, doch kann erst in Zusammenhang mit einer Mutationsanalyse der Funktionsverlust eines Gens sicher nachgewiesen werden. Um das Auftreten eines LOH in einer Subpopulation auszuschließen, müssen Analysen in Bezug auf die Tumorerheterogenität in der chromosomalen Region um Fanc F vorgenommen werden. Die gezielte Extraktion der DNA mittels Laser-Mikrodissektion aus mehreren Arealen eines Tumors kann hier ein geeigneter Ansatz sein. Auch die Durchführung einer Einzelzell-Mikrodissektion ist möglich. So kann mit diesen Ergebnissen die Rolle eines Allelverlusts innerhalb einer Subpopulation entweder verifiziert oder falsifiziert werden. Die genaue Untersuchung des *background levels* für die LOH-Frequenzen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs stellt einen weiteren Schritt dar. Interessant wäre auch zu schauen, ob Patienten mit einer familiären Vorbelastung von Krebserkrankungen genetische Besonderheiten in Bezug auf die Fanconi Anämie aufweisen. Da in der vorliegenden Arbeit nur T2-, T3- oder T4-Tumorstadien verwendet wurden, könnte ein weiterer Schritt, auf dem Weg zur Erstellung eines genetischen Progressionsmodells für Fanc, die Untersuchung von Leukoplakiestadien und Karzinoma in situ auf einen Allelverlust innerhalb der chromosomalen Regionen sein. Ziel wäre die Prognose zur Entartung einer Leukoplakie und folgendermaßen das individuelle Vorhersage eines zukünftig bösartigen Verhaltens einer Leukoplakie. Im Idealfall wird der Weg für die Entwicklung eines Leukoplakie-Schnelltests geebnet.

8 Literaturverzeichnis

- Ahmad, S.; Kirk, S.** (2006) <grover@ohsu.edu>: *Molecular Mechanisms of Fanconi Anemia – Chapter 2*. Springer Verlag
- American Cancer Society** (2008): *Cancer Facts & Figures 2012*. URL: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>
- Baffa, R.; Negrini, M.; Mandes, B.; Rugge, M.; Ranzani, G.; Hirohashi, S.; Croce, C.** (1996): *Loss of Heterozygosity for Chromosome 11 in Adenocarcinoma of the Stomach*. *Cancer Research* 56(2): 268 – 72
- Beder, L.; Gunduz, M.; Ouchida, M.; Fukushima, K.; Gunduz, E.; Ito, S.; Sakai, A.; Nagai, N.; Nishizaki, K.; Shimizu, K.** (2003) <shimke47@md.okayama-u.ac.jp>: *Genome-Wide Analyses on Loss of Heterozygosity in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*. *Laboratory Investigation* 83(1): 99 – 105
- Blons, H.; Cabelguenne, A.; Carnot, F.; Laccourreye, O.; de Waziers, I.; Hamelin, R.; Brasnu, D.; Beaune, P.; Laurent-Puig, P.** (1999): *Microsatellite analysis and response to chemotherapy in head-and-neck squamous-cell carcinoma*. *International Journal of Cancer* 84(4): 410 - 415
- Boland, C.; Thibodeau, S.; Hamilton, S.; Sidransky, D.; Eshleman, J.; Burt, R.; Meltzer, S.; Rodriguez-Bigas, M.; Fodde, R.; Ranzani, G. Srivastava, S.** (1998) <crboland@ucsd.edu>: *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer*. *Cancer Research*: 58(22):5248 - 5257
- Buselmaier, W.; Tariverdian, G.** (2005): *Humangenetik Für Biologen*. Springer Verlag
- Califano, J.; van der Riet, P.; Westra, W.; Nawroz, H.; Clayman, G.; Piantadosi, S.; Corio, R.; Lee, D.; Greenberg, B.; Koch, W.; Sidransky, D.** (1996): *Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization*. *Cancer Research* 56: 2488 - 2492
- Cantor, S. & Guillemette, S.** (2011) <sharon.cantor@umassmed.edu>: *Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCD1/BACH1/BRIP1*. *Future Oncology* 7(2): 253 - 261
- Canzian, F.; Salovaara, R.; Hemminki, A.; Kristo, P.; Chadwick, R.; Aaltonen, L.; de la Chapelle, A.** (1996) <>: *Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors*. *Cancer Research* 56(14):3331 - 3337
- Carr, L.; Gottschling, D.** (2008) <dgottsch@fhrc.org>: *Does age influence loss of heterozygosity?* *Experimental Gerontology* 43(3):123 - 129
- Castellsagué, X.; Quintana, M.; Martínez, M.; Nieto, A.; Sánchez, M.; Juan, A.; Monner, A.; Carrera, M.; Agudo, A.; Quer, M.; Muñoz, N.; Herrero, R.; Franceschi, S.; Bosch, F.** (2004) <xcastellsague@ico.scs.es>: *The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis*. *International Journal of Cancer* 108(5):741 - 749
- Cawkwell, L.; Bell, S.; Lewis, F.; Dixon, M.; Taylor, G.; Quirke, P.** (1993): *Rapid detection of allele loss in colorectal tumours using microsatellites and fluorescent DNA technology*. *British Journal of Cancer* 67(6): 1262 - 1267
- Chakrabarti, S.; Sengupta, S.; Sengupta, A.; Basak, S.; Roy, A.; Panda, C.; Roychoudhury, S.** (2006): *Genomic instabilities in squamous cell carcinoma of head and neck from Indian population*. *Molecular Carcinogenesis* 45(4):270 - 277
- Chamberlain, J.; Gibbs, R.; Ranier, J.; Nguyen, P.; Caskey, C.** (1988): *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. *Nucleic Acids Research* 16(23): 11141–11156.

- Chen, C.;** Chang, C.; Yang, W.; Chen, C.; Fann, C. (2003) <chchen@ibms.sinica.edu.tw>: *A genome-wide scan using tree-based association analysis for candidate loci related to fasting plasma glucose levels*. BMC Genetics 4 (1): 65
- Cheng, L. & Zhang, D.** (2008): *Molecular Genetic Pathology*. Springer Verlag: S. 279
- Chichon, S.;** Freudenberg, J.; Propping, P.; Nöthen, M. (2002) <svcichon@uia.ua.ac.be>: *Variabilität im menschlichen Genom*. Deutsches Ärzteblatt 99 (46): 3091-3101
- Cruz, I.;** Snijders, P.; Steenbergen, R.; Meijer, C.; Snow, G.; Walboomers, J.; van der Waal, I. (1996): *Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas*. European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology 32B(1): 55 - 62
- De Schutter, H.;** Spaepen, M.; Van Opstal, S.; Vander Poorten, V.; Verbeken, E.; Nuyts, S. (2009) <sandra.nuyts@uzleuven.be>: *The prevalence of microsatellite instability in head and neck squamous cell carcinoma*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 135: 485-490
- de Winter, J.;** Rooimans, M.; van Der Weel, L.; van Berkel, C.; Alon, N.; Bosnoyan-Collins, L.; de Groot, J.; Zhi, Y.; Waisfisz, Q.; Pronk, J.; Arwert, F.; Mathew, C.; Scheper, R.; Hoatlin, M.; Buchwald, M.; Joenje, H. (2000) <H.Joenje.HumGen@med.vu.nl>: *The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM*. Nature Genetics 24 (1): 15 - 16
- de Winter, J.;** van der Weel, L.; de Groot, J.; Stone, S.; Waisfisz, Q.; Arwert, F.; Scheper, R.; Kruyt, F.; Hoatlin, M.; Joenje, H. (2000) <h.joenje.humgen@med.vu.nl>: *The fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG*. Human Molecular Genetics 9(18): 2665 - 2674
- de Winter, J.;** Waisfisz, Q.; Rooimans, M.; van Berkel, C.; Bosnoyan-Collins, L.; Alon, N.; Carreau, M.; Bender, O.; Demuth, I.; Schindler, D.; Pronk, J.; Arwert, F.; Hoehn, H.; Digweed, M.; Buchwald, M.; Joenje, H. (1998): *The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9*. Nature Genetics 20(3): 281 - 283
- Deakynne, J.;** Mazin, A. (2001) <amazin@drexelmed.edu>: *Fanconi Anemia: at the Crossroads of DNA Repair*. Biochemistry 76(1): 36 - 48
- Demuth, I.;** Wlodarski, M.; Tipping, A.; Morgan, N.; de Winter, J.; Thiel, M.; Gräsl, S.; Schindler, D.; D'Andrea, A.; Altay, C.; Kayserili, H.; Zatterale, A.; Kunze, J.; Ebell, W.; Mathew, C.; Joenje, H.; Sperling, K.; Digweed, M. (2000) <martin.digweed@charite.de>: *Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, FANCG/XRCC9*. European Journal of Human Genetics 8: 861 - 868
- Dietmaier, W.** (2010) <wolfgang.dietmaier@klinik.uni-regensburg.de>: *Mikrosatelliteninstabilität - Ein neuer prädiktiver Marker*. Pathologe 23(1): 268 - 273
- Digweeda, M.;** Hoehnb, H.; Sperlinga, K. (2007): *Milestones in Fanconi Anemia Research*. Karger AG: 23 - 38
- El-Naggar, A.;** Hurr, K.; Huff, V.; Clayman, G.; Luna, M.; Batsakis, J. (1996b): *Microsatellite instability in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma*. The American Journal of Pathology 148(6): 2067 - 2072
- El-Naggar, A.;** Hurr, K.; Huff, V.; Luna, M.; Goepfert, H.; Batsakis, J. (1996a): *Allelic loss and replication errors at microsatellite loci on chromosome 11p in head and neck squamous carcinoma: association with aggressive biological features*. Clinical Cancer Research 2(5): 903 - 907
- El-Naggar, A.;** Hurr, K.; Batsakis, J.; Luna, M.; Goepfert, H.; Huff, V. (1995): *Sequential Loss of Heterozygosity at Microsatellite Motifs in Preinvasive and Invasive Head and Neck Squamous Carcinoma*. Cancer Research 55: 2656 - 2659
- Emi, M.;** Fujiwara, Y.; Nakajima, T.; Tsuchiya, E.; Tsuda, H.; Hirohashi, S.; Maeda, Y.; Tsurua, K.; Miyaki, M.; Nakamura, Y. (1992): *Frequent Loss of Heterozygosity for Loci on Chromosome 8p in Hepatocellular Carcinoma, Colorectal Cancer, and Lung Cancer*. Cancer Research 52: 5368 - 5372
- Engelhardt, H.;** Beck, W.; Schmitt, T. (1994): *Kapillarelektrophorese*. Springer Vieweg Verlag
- Fearon, E.;** Feinberg, A.; Hamilton, S.; Vogelstein, B. (1985): *Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer*. Nature 318(6044): 377 - 380

- Field, J.;** Kiaris, H.; Howard, P.; Vaughan, E.; Spandidos, D.; Jones, A. (1995): *Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck*. British Journal of Cancer 71(5): 1065 – 1069
- Figüero Ruiz, E.;** Carretero Peláez, M.; Cerero Lapiedra, R.; Esparza Gómez, G.; Moreno López, L. (2004) <efigueroiz@hotmail.com>: *Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer*. Medicina Oral 9(1):14 - 23
- Fong, K.;** Kida, Y.; Zimmerman, P.; Ikenaga, M.; Smith, P. (1995): *Loss of Heterozygosity Frequently Affects Chromosome 17q in Non-Small Cell Lung Cancer*. Cancer Research 55(19): 4268 - 4272
- Forastiere, A.;** Koch, W.; Trotti, A.; Sidransky, D. (2001): *Head and Neck Cancer*. The New England Journal of Medicine 345:1890 - 1900
- Foulkes, W.;** Campbell, I.; Stamp, G.; Trowsdale, J. (1993): *Loss of heterozygosity and amplification on chromosome 11q in human ovarian cancer*. British Journal of Cancer 67(2): 268 - 273
- Futreal, P.;** Liu, Q.; Shattuck-Eidens, D.; Cochran, C.; Harshman, K.; Tavtigian, S.; Bennett, L.; Haugen-Strano, A.; Swensen, J.; Miki, Y. (1994): *BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas*. Science 266(5182): 120 – 122
- Gallmeier, E.;** Calhoun, E.; Rago, C.; Brody, J.; Cunningham, S.; Hucl, T.; Gorospe, M.; Kohli, M.; Lengauer, C.; Kern, S. (2006): *Targeted disruption of FANCC and FANCG in human cancer provides a preclinical model for specific therapeutic options*. Gastroenterology 130: 2145 - 2154
- Ganten, D.;** Ruckpaul, K. (2007): *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Springer Verlag, 3. Auflage
- Ganten, D.;** Ruckpaul, K.; Hahn, S.; Schmiegell, W. (2002): *Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen*. Springer Verlag
- Gasco, M.;** Crook, T. (2003): *The p53 network in head and neck cancer*. Oral Oncology 39(3): 222 - 231
- Gey, M.** (2008) : *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. Springer Verlag
- Gillison, M.;** Koch, W.; Capone, R.; Spafford, M.; Westra, W.; Wu, L.; Zahurak, M.; Daniel, R.; Viglione, M.; Symer, D.; Shah, K.; Sidransky, D. (2000): *Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers*. J Natl Cancer Inst. 92(9): 709 – 720
- Gleich, L.;** Wang, J.; Gluckman, J.; Fenoglio-Preiser, C. (2003): *Microsatellite instability as a predictor of survival in head and neck cancer -- is there a link with colon cancer?* ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 65(4): 193 - 198
- Graw, J.** (2010): *Genetik*. Springer Verlag, 5. Auflage
- Gudmundsson, J.;** Barkardottir, R.; Eiriksdottir, G.; Baldursson, T.; Arason, A.; Egilsson, V.; Ingvarsson, S. (1995): *Loss of heterozygosity at chromosome 11 in breast cancer: association of prognostic factors with genetic alterations*. British Journal of Cancer 72(3): 696 – 701
- Hahn, M.;** Wieland, I.; Koufaki, O.; Görgens, H.; Sobottka, S.; Schackert, G.; Schackert, H. (1999) <Matthias.Hahn@mailbox.tu-dresden.de>: *Genetic alterations of the tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in human brain metastases*. Clinical Cancer Research 5(9): 2431 - 2437
- Ho, W.;** Chang, J.; Tseng, R.; Chen, J.; Chen, C.; Jou, Y.; Wang, Y. (2002) <t43017@cc.ntnu.edu.tw>: *Loss of heterozygosity at loci of candidate tumor suppressor genes in microdissected primary non-small cell lung cancer*. Cancer Detection and Prevention Journal 26(5): 343 - 349
- Howaldt, H.;** Vorast, H.; Blecher, J.; Reicherts, M.; Kainz, M. (2000): *Ergebnisse aus dem DÖSAK-Tumorregister*. Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie 4(1): 216 – 225
- Ichimura, K.;** Schmidt, E.; Miyakawa, A.; Goike, H.; Collins, V. (1998): *Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades*. Genes, Chromosomes and Cancer 22(1): 9-15

- Idbaih, A.;** Silva, R.; Crinière, E.; Marie, Y.; Carpentier, C.; Boisselier, B.; Taillibert, S.; Rousseau, A.; Mokhtari, K.; Ducray, F.; Thillet, J.; Sanson, M.; Hoang-Xuan, K.; Delattre, J. (2008) <ahmed.idbaih@gmail.com>: *Genomic changes in progression of low-grade gliomas*. Journal of Neuro-Oncology 90: 133 – 140
- Indraccolo, S.;** Tisato, V.; Agata, S.; Moserle, L.; Ferrari, S.; Callegaro, M.; Persano, L.; Palma, M.; Scaini, M.; Esposito, G.; Fassina, A.; Nicoletto, O.; Plebani, M.; Chieco-Bianchi, L.; Amadori, A.; D'Andrea, E.; Montagna, M. (2006) <stefano.indraccolo@unipd.it>: *Establishment and characterization of xenografts and cancer cell cultures derived from BRCA1 -/- epithelial ovarian cancers*. European Journal of Cancer. 42 (10):1475 - 1483
- Ishwad, C.;** Ferrell, R.; Rossie, K.; Appel, B.; Johnson, J.; Myers, E.; Law, J.; Srivastava, S.; Gollin, S. (1995): *Microsatellite instability in oral cancer*. International Journal of Cancer 64(5): 332 - 335
- Jacquemont, C. & Taniguchi, T.** (2007) <taniguc@fhcrc.org>: *The Fanconi anemia pathway and ubiquitin*. BMC Biochemistry 8(1): 1 - 10
- Jemal, A.;** Bray, F.; Center, M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. (2011) <ahmedin.jemal@cancer.org>: *Global cancer statistics*. Cancer Journal for Clinicians 61(2): 69 – 90
- Jones, P.;** Laird, P. (1999) <jones_p@froggy.hsc.usc.edu>: *Cancer epigenetics comes of age*. Nature Genetics 21(2):163 - 167
- Joseph, A. & D'Souza, G.** (2012): *Epidemiology of human papillomavirus-related head and neck cancer*. Otolaryngologic Clinics of North America 45(4): 739 – 764
- Kademani, D.** (2007) <kademani.deepak@mayo.edu>: *Oral cancer*. Mayo Clinic Proceedings 82(7): 878 – 887
- Knudson, A.** (1971): *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences 68 (4): 820 – 823
- Korpershoek, E.;** Stobbe, C.; van Nederveen, F.; de Krijger, R.; Dinjens, W. (2010) <e.korpershoek.1@erasmusmc.nl>: *Intra-tumoral molecular heterogeneity in benign and malignant pheochromocytomas and extra-adrenal sympathetic paragangliomas*. Endocrine-Related Cancer 17(3):653 – 662
- Koul, S.;** McKiernan, J.; Narayan, G.; Houldsworth, J.; Bacik, J.; Dobrzynski, D.; Assaad, A.; Mansukhani, M.; Reuter, V.; Bosl, G.; Chaganti, R.; Murty, V. (2004) <sk1276@columbia.edu>: *Role of promoter hypermethylation in Cisplatin treatment response of male germ cell tumors*. Molecular Cancer 3: 16
- Koy, S.;** Plaschke, J.; Luksch, H.; Friedrich, K.; Kuhlisch, E.; Eckelt, U.; Martinez, R. (2008) <susanne.koy@web.de>: *Microsatellite instability and loss of heterozygosity in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head & Neck 30(8): 1105 - 1113
- Krieger, S.** (2011): *Pathologie-Lehrbuch für Heilpraktiker: Nachschlagewerk mit Therapiehinweisen*. Sonntag Verlag, 6. Auflage
- Kutler, D.;** Auerbach, A.; Satagopan, J.; Giampietro, P.; Batish, S.; Huvos, A.; Goberdhan, A.; Shah, J.; Singh, B. (2003b) <singhb@mskcc.org>: *High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia*. Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery 129(1):106-12.
- Kutler, D.;** Singh, B.; Satagopan, J.; Batish, S.; Berwick, M.; Giampietro, P.; Hanenberg, H.; Auerbach, A. (2003a) <auerbac@mail.rockefeller.edu>: *A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)*. Blood 101(4): 1249-1256
- Lam, C.;** Tang, C.; Lau, K.; Lung, M. (2002): *Loss of heterozygosity on chromosome 11 in esophageal squamous cell carcinomas*. Cancer Letters 178(1): 75 - 81
- Levinson, G.;** Gutman, G. (1987): *Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution*. Molecular Biology and Evolution 4(3): 203 - 221
- Levitus, M.;** Rooimans, M.; Steltenpool, J.; Cool, N.; Oostra, A.; Mathew, C.; Hoatlin, M.; Waisfisz, Q.; Arwert, F.; de Winter, J.; Joenje, H. (2004): *Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes*. Blood 103(7): 2498 - 2503

- Levitus, M.**; Waisfisz, Q.; Godthelp, B.; de Vries, Y.; Hussain, S.; Wiegant, W.; Elghalbzouri-Maghrani, E.; Steltenpool, J.; Rooimans, M.; Pals, G.; Arwert, F.; Mathew, C.; Zdzienicka, M.; Hiom, K.; De Winter, J.; Joenje, H. (2005): *The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J*. Nature Genetics 37: 934 –935
- Levran, O.**; Attwooll, C.; Henry, R.; Milton, K.; Neveling, K.; Rio, P.; Batish, S.; Kalb, R. Velleuer, E.; Barral, S.; Ott, J.; Petrini, J.; Schindler, D.; Hanenberg, H.; Auerbach, A. (2005): *The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia*. Nature Genetics 37: 931 - 933
- Li, X.**; Lee, N.; Ye, Y.; Waber, P.; Schweitzer, C.; Cheng, Q.; Nisen, P. (1994): *Allelic Loss at Chromosomes 3p, 8p, 13q, and 17p Associated With Poor Prognosis in Head and Neck Cancer*. Journal of the National Cancer Institute 86(20): 1524 - 1529
- Litman, R.**; Peng, M.; Jin, Z.; Zhang, F.; Zhang, J.; Powell, S.; Andreassen, P.; Cantor, S. (2005): *BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF*. Cancer Cell 8: 255 - 165.
- Losi, L.**; Baisse, B.; Bouzourene, H.; Benhattar, J. (2005) <jean.benhattar@chuv.hospvd.ch>: *Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression*. Carcinogenesis 26(5): 916 – 922
- Marsit, C.**; Liu, M.; Nelson, H.; Posner, M.; Suzuki, M.; Kelsey, K. (2004) <kelsey@hsph.harvard.edu>: *Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival*. Oncogene 23(4): 1000 - 1004
- Mathew, C.** (2006) <christopher.mathew@genetics.kcl.ac.uk>: *Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer*. Oncogene 25(43): 5875 - 5884
- Mathew, G.** (2006) <christopher.mathew@genetics.kcl.ac.uk>: *Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer*. Oncogene 25, 5875 – 5884
- Matsuura, K.**; Shiga, K.; Yokoyama, J.; Tateda, M.; Nakano, H.; Saijo, S.; Takasaka, T. (1999): *Loss of heterozygosity of 3p21 and 9p21 in head and neck squamous cell carcinomas and its prognostic implication*. Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho 102(5): 613 – 621
- Medintz, I.**; Lee, C.; Wong, W.; Pirkola, K.; Sidransky, D.; Mathies, R. (2000) <Rich@zinc.cchem.berkeley.edu>: *Loss of Heterozygosity Assay for Molecular Detection of Cancer Using Energy-transfer Primers and Capillary Array Electrophoresis*. Genome Research 10(8):1211 - 1218
- Merlo, A.**; Gabrielson, E.; Mabry, M.; Vollmer, R.; Baylin, S.; Sidransky, D. (1994): *Homozygous Deletion on Chromosome 9p and Loss of Heterozygosity on 9q, 6p, and 6q in Primary Human Small Cell Lung Cancer*. Cancer Research 54(9): 2322 – 2326
- Miki, Y.**; Swensen, J.; Shattuck-Eidens, D.; Futreal, P.; Harshman, K.; Tavtigian, S.; Liu, Q.; Cochran, C.; Bennett, L.; Ding, W. (1994): *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science 266(5182): 66 – 71
- Misholi, A.** (2010) <ariel@techniklexikon.net>: Zugriff (21/06/2012) URL: <http://www.techniklexikon.net/d/kapillarelektrophorese/kapillarelektrophorese.htm>
- Mondal, G.**; Tripathi, A.; Bhattacharya, N.; Sikdar, N.; Roy, A.; Sengupta, A.; Roy, B.; Panda, C.; Roychoudhury, S. (2003): *Allelic imbalance at chromosome 11 in head and neck squamous cell carcinoma in an Indian patient population*. Journal of Clinical Pathology 56: 512 - 518
- Mork, J.**; Lie, A.; Glatte, E.; Hallmans, G.; Jellum, E.; Koskela, P.; Møller, B.; Pukkala, E.; Schiller, J.; Youngman, L.; Lehtinen, M.; Dillner, J. (2001) <jon.mork@ioks.uio.no>: *Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. The New England Journal of Medicine 344(15): 1125 – 1131
- Mülhardt, C.** (2009): *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage
- Murken, J.**; Grimm, T.; & Holinski-Feder, E. (2006): *Taschenlehrbuch Humangenetik*. Georg Thime Verlag, 7. Auflage

- Nagao, T.;** Sugano, I.; Ishida, Y.; Tajima, Y.; Munakata, S.; Asoh, A.; Yamazaki, K.; Muto, H.; Konno, A.; Kondo, Y.; Nagao, K. (2000) <t-nagao@med.teikyo-u.ac.jp>: *Primary large-cell neuroendocrine carcinoma of the parotid gland: immunohistochemical and molecular analysis of two cases*. *Modern Pathology* 5(5):554 – 561
- Narayan, G.;** Arias-Pulido, H.; Nandula, S.; Basso, K.; Sugirtharaj, D.; Vargas, H.; Mansukhani, M.; Villella, J.; Meyer, L.; Schneider, A.; Gissmann, L.; Dürst, M.; Pothuri, B.; Murty, V. (2004): *Promoter hypermethylation of FANCF: disruption of Fanconi Anemia-BRCA pathway in cervical cancer*. *Cancer Research* 64(9): 2994 – 2997
- Nawroz, H.;** van der Riet, P.; Hruban, R.; Koch, W.; Ruppert, J.; Sidransky, D. (1994): *Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Research* 54(5): 1152 - 1155
- Ng, I.;** Xiao, L.; Lam, K.; Yuen, P.; Ng, M. (2000) <iolng@hkusua.hku.hk>: *Microsatellite alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck - clustering of loss of heterozygosity in a distinct subset*. *Oral Oncology* 36(5):484 - 90
- Olopade, O. & Wie, M.** (2003) <folopade@medicine.bsd.uchicago.edu>: *FANCF methylation contributes to chemoselectivity in ovarian cancer*. *Cancer Cell* 3(5): 417- 420
- Orsetti, B.;** Courjal, F.; Cuny, M.; Rodriguez, C.; Theillet, C. (1999): *17q21-q25 aberrations in breast cancer: combined allelotyping and CGH analysis reveals 5 regions of allelic imbalance among which two correspond to DNA amplification*. *Oncogene* 18: 6262 – 6270
- Parkin, D.;** Bray, F.; Ferlay, J.; Pisani, P. (2005): *Global cancer statistics, 2002*. *A Cancer Journal for Clinicians* 55(2): 74 – 108
- Paulson, T.;** Galipeau, P.; Reid, B. (1999) <bjr@fhcrc.org>: *Loss of Heterozygosity Analysis Using Whole Genome Amplification, Cell Sorting, and Fluorescence-Based PCR*. *Genome Research* 9(5):482 - 491
- Paulson, T.;** Wright, F.; Parker, B.; Russack, V.; Wahl, G. (1996): *Microsatellite Instability Correlates with Reduced Survival and Poor Disease Prognosis in Breast Cancer*. *Cancer Research* 56: 4021 - 4026
- Pehlivan, D.;** Gunduz, E.; Gunduz, M.; Nagatsuka, H.; Beder, L.; Cengiz, B.; Rivera, R.; Fukushima, K.; Palanduz, S.; Ozturk, S.; Yamanaka, N.; Shimizu, K. (2008) <mgunduz@md.okayama-u.ac.jp>: *Loss of heterozygosity at chromosome 14q is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 134(12):1267 - 1276
- Piccinin, S.;** Gasparotto, D.; Vukosavljevic, T.; Barzan, L.; Sulfaro, S.; Maestro, R.; Boiocchi, M. (1998): *Microsatellite instability in squamous cell carcinomas of the head and neck related to field cancerization phenomena*. *International Journal of Cancer* 78(9):1147 - 1151
- Popat, S.;** Hubner, R.; Houlston, R. (2005): *Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis*. *Journal of Clinical Oncology* 23(3): 609 - 618
- Powlesland, R.;** Charles, A.; Malik, K.; Reynolds, P.; Pires, S.; Boavida, M.; Brown, K. (2000): *Loss of heterozygosity at 7p in Wilms' tumour development*. *British Journal of Cancer* 82 (2): 323 – 329
- Ragin, C.;** Modugno, F.; Gollin, S. (2007): *The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus*. *Journal of Dental Research* 86(2):104 – 114
- Reeve, A.;** Sih, S.; Raizis, A.; Feinberg, A. (1989): *Loss of Allelic Heterozygosity at a Second Locus on Chromosome 11 in Sporadic Wilms' Tumor Cells*. *Molecular and Cellular Biology* 9(4):1799 – 7803
- Richter, G.** (2003): *Praktische Biochemie – Grundlagen und Techniken*. Georg Thieme Verlag
- Riechelmann, H.** (2001) <herbert.riechelmann@medizin.uni-ulm.de>: *Berufliche Verursachung und Bewertung von Mundhöhlen- und Rachentumoren*. *Laryngorhinootologie* 81(8): 573 - 579
- Ringström, E.;** Peters, E.; Hasegawa, M.; Posner, M.; Liu, M.; Kelsey, K. (2002) <kelsey@hsph.harvard.edu>: *Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Clinical Cancer Research* 8(10):3187 - 3192

- Robert Koch Institut** (2012) <gbe@rki.de>: *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Zentrum für Krebsregisterdaten (GEKID) 8. Ausgabe
- Rosenberg, P.**; Greene, M.; Alter, B. (2003) <alterb@mail.nih.gov>: *Cancer incidence in persons with Fanconi anemia*. *Blood* 101(3):822 - 826
- Sadick, M.**; Schoenberg, S.; Hoermann, K.; Sadick, H. (2012): *Aktuelle Standards und Fortschritte in der onkologischen Bildgebung von Kopf-Hals-Tumoren*. Georg Thieme Verlag: Laryngo-Rhino-Otollogie
- Saiki, R.**; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.; Horn, G.; Erlich, H.; Arnheim, N. (1985): *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science* 230 (4732): 1350-1354
- Sankaranarayanan, R.**; Masuyer, E.; Swaminathan, R.; Ferlay, J.; Whelan, S. (1998): *Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis*. *Anticancer Research* 18(6B):4779 - 4786
- Schaaf, C.** und Zschocke, J. (2008) <schaaf@bcm.edu>: *Basiswissen Humangenetik*. Springer Medizin Verlag
- Schimming, R.** (2002) <ronald_schimming@zmk2.ukl.uni-freiburg.de>: *Tumorangiogenese – Stellenwert und Bedeutung beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle*. *Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie* 6(4): 217 – 230
- Scholz, S.**; Lütticke, S.; Rohrer, C. (2001) <s_scholz@gmx.net>: *Optimierung einer Multiplex-PCR*. *Biospektrum* 7: 78 – 79
- Schroeder, W.**; Chao, L.; Dao, D.; Strong, L.; Pathak, S.; Riccardi, V.; Lewis, W.; Saunders, G. (1987): *Nonrandom Loss of Maternal Chromosome 11 Alleles in Wilms Tumors*. *The American Journal of Human Genetics* 40(5): 413 - 420
- Schulte-Hermann, R.**; Parzefall, W. (2010) <>: *Mehrstuufenprozess der Kanzerogenese und chemische Kanzerogenese*. Springer Medizin Verlag, Die Onkologie: 181-223
- Siewert, J.** (2001): *Chirurgie*. Springer Verlag, 7. Auflage
- Siewert, J.** (2006): *Chirurgie*. Springer Verlag, 8. Auflage
- Singer, M.**; Berg, P. (1992): *Gene und Genome*. Spektrum Akademischer Verlag
- Skotheim, R.**; Diep, C.; Kraggerud, S.; Jakobsen, K.; Lothe, R. (2001) <rlothe@radium.uio.no>: *Evaluation of loss of heterozygosity/allelic imbalance scoring in tumor DNA*. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 127(1):64 - 70
- Soulier, J.** (2011) <jean.soulier@sls.aphp.fr>: *Fanconi anemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011:492 -497
- Strachan, T.** (1994): *Das menschliche Genom*. Spektrum Akademischer Verlag
- Sudhir, S.** (1998): *Molecular Pathology of Early Cancer - Chapter 28: Loss of heterozygosity*. IOS Press: 435 - 446
- Takahashi, S.**; Shan, A.; Ritland, S.; Delacey, K.; Bostwick, D.; Lieber, M.; Thibodeau, S.; Jenkins, R. (1995): *Frequent Loss of Heterozygosity at 7q31.1 in Primary Prostate Cancer Is Associated with Tumor Aggressiveness and Progression*. *Cancer Research* 55(18): 4114 - 4119
- Taniguchi, T.**; Tischkowitz, M.; Ameziane, N.; Hodgson, S.; Mathew, C.; Joenje, H.; Mok, S.; D'Andrea, A. (2003) <alan_dandrea@dfci.harvard.edu>: *Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors*. *Nature Medicine* 9(5): 568 – 574
- Tarmin, L.**; Yin, J.; Zhou, X.; Suzuki, H.; Jiang, H.; Rhyu, M.; Abraham, J.; Krasna, M.; Cottrell, J.; Meltzer, S. (1994): *frequent loss of heterozygosity on chromosome 9 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus*. *Cancer Research* 54: 6094 – 6096
- Thiagalingam, S.**; Foy, R.; Cheng, K.; Lee, H.; Thiagalingam, A.; Ponte, J. (2002) <samthia@bu.edu>: *Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence*. *Current Opinion in Oncology* 14: 65 – 72

- Timpert, K.** (2003): *Molekulargenetische Untersuchungen zur Pathogenese des Mammakarzinoms: Untersuchung zur Beteiligung des Kandidatengens MGEA5 auf dem Chromosom 10 an der Pathogenese des sporadischen Mammakarzinoms*. Dissertation der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Tomlinson, I.**; Strickland, J.; Bromley, L.; Evans, M.; Morton, J.; McGee, J. (1995): *Loss of heterozygosity on chromosome 11 q in breast cancer*. Journal of Clinical Pathology 48(5): 424 – 428
- Tripathi, A.**; Dasgupta, S.; Roy, A.; Sengupta, A.; Roy, B.; Roychowdhury, S.; Panda, C. (2003) <ckpanda@vsnl.net>: *Sequential Deletions in both Arms of Chromosome 9 are Associated with the Development of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Indian Patients*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 22(2): 289 - 297
- van der Riet, P.**; Nawroz, H.; Hruban, R.; Corio, R.; Tokino, K.; Koch, W.; Sidransky, D. (1994): *Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression*. Cancer Research 54(5):1156 - 1158
- van Houten, V.**; Snijders, P.; van den Brekel, M.; Kummer, J.; Meijer, C.; van Leeuwen, B.; Denkers, F.; Smeele, L.; Snow, G.; Brakenhoff, R. (2001): *Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas*. International Journal of Cancer 93(2): 232 – 235
- van Zeeburg, H.**; Snijders, P.; Pals, G.; Hermesen, M.; Rooimans, M.; Bagby, G.; Soulier, J.; Gluckman, E.; Wennerberg, J.; Leemans, C.; Joenje, H.; Brakenhoff, R. (2005) <rh.brakenhoff@vumc.nl>: *Generation and Molecular Characterization of Head and Neck Squamous Cell Lines of Fanconi Anemia Patients*. Cancer Research 65 (4): 1271 – 1276
- Vohr, H.** (2010): *Toxikologie: Band 1: Grundlagen der Toxikologie*. Wiley Verlag
- Wagener, C.**; Müller, O. (1996): *Einführung in die Molekulare Onkologie: Veränderung und Wirkung von Tumorgenen und Tumorproteinen*. Georg Thieme Verlag, 3. Auflage
- Warnakulasuriya, S.** (2009) <s.warne@kcl.ac.uk>: *Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer*. Oral Oncology 45: 309 – 316
- Whibley, C.**; Pharoah, P.; Hollstein, M. (2009): *p53 polymorphisms: cancer implications*. Nature Reviews Cancer 9(2): 95 – 107
- Wolman, S. & Heppner, G.** (1992): *Genetic Heterogeneity in Breast Cancer*. Journal of the National Cancer Institute 84(7): 469 – 470
- Wooster, R.**; Bignell, G.; Lancaster, J.; Swift, S.; Seal, S.; Mangion, J.; Collins, N.; Gregory, S.; Gumbs, C.; Micklem, G. (1995): *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature 378(6559): 789 - 792
- Wrba, F.** (2001): *Suppressorgene und Onkogene: Grundlagen der Tumorgenese – Grundlagen der Tumorgenese*. UTB Verlag
- Wreesmann, V.**; Estilob, C.; Eiselea, D.; Singhb, B.; Wanga, S. (2007) <swang@ohns.ucsf.edu>: *Downregulation of Fanconi Anemia Genes in Sporadic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Journal for Oto-Rhino-Laryngology 69: 218 – 225
- Xie, J.**; Peng, M.; Guillemette, S.; Quan, S.; Maniatis, S.; Wu, Y.; Venkatesh, A.; Shaffer, S.; Brosh, R.; Cantor, S. (2012) <Sharon.Cantor@umassmed.edu>: *FANCI/BACH1 Acetylation at Lysine 1249 Regulates the DNA Damage Response*. PLoS Genetics (7): 1-14
- Yee, C.**; Roodi, N.; Verrier, S.; Parl, F. (1994): *Microsatellite Instability and Loss of Heterozygosity in Breast Cancer*. Cancer Research 54: 1641 – 1644
- Zuo, C.**; Zhang, H.; Spencer, H.; Vural, E.; Suen, J.; Schichman, S.; Smoller, B.; Kokoska, M.; Fan, C. (2009): *Increased microsatellite instability and epigenetic inactivation of the hMLH1 gene in head and neck squamous cell carcinoma*. Otolaryngology - Head and Neck Surgery 141(4): 484 - 490

9 Anlagen

Anlage 1	klinische Patientendaten des untersuchten Patientenkollektivs	I
Anlage 2	Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D9S163	III
Anlage 3	Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D9S1853	III
Anlage 4	Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D11S1981	III
Anlage 5	Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D17S1855	III
Anlage 6	Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D17S1607	III
Anlage 7	Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D9S171	III
Anlage 8	Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D11S1392	III
Anlage 9	Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D11S1359	III
Anlage 10	Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit und ohne ein Rezidiv	IV
Anlage 11	Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei T2-, T3- und T4-Tumore	IV
Anlage 12	Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei verschiedenen Differenzierungsgraden.....	V
Anlage 13	Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Patientenalter bei Erkrankung	VI
Anlage 14	Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Geschlecht	VI
Anlage 15	Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Tumorstadium	VI
Anlage 16	Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Nikotin-/Alkoholmissbrauch.....	VII
Anlage 17	Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Auftreten eines Rezidivs	VII
Anlage 18	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D9S1853	VIII
Anlage 19	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D9S171	VIII
Anlage 20	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D9S163	IX
Anlage 21	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Fanc G in Abhängigkeit vom Tumorstadium..	IX
Anlage 22	Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Patientenalter bei Erkrankung	X
Anlage 23	Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Geschlecht	X
Anlage 24	Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Tumorstadium	X
Anlage 25	Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Nikotin-/Alkoholmissbrauch.....	XI
Anlage 26	Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Auftreten eines Rezidivs	XI
Anlage 27	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D11S1981	XII
Anlage 28	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D11S1359	XII
Anlage 29	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D11S1392	XIII
Anlage 30	Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Patientenalter bei Erkrankung	XIV
Anlage 31	Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Geschlecht	XIV
Anlage 32	Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Tumorstadium	XIV
Anlage 33	Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Nikotin-/Alkoholmissbrauch.....	XV

Anlage 34	Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Auftreten eines Rezidivs	XV
Anlage 35	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D17S1855	XVI
Anlage 36	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D11S1392	XVI
Anlage 37	Errechnete Werte bei der Elektropherogrammauswertung.....	XVII

9.1 Anlage Teil 1 - klinische Patientendaten

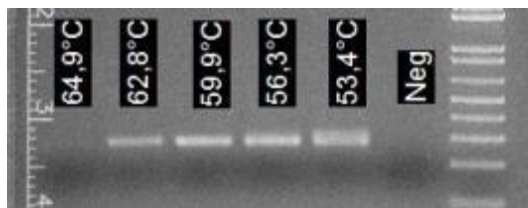
Anlage 1 klinische Patientendaten des untersuchten Patientenkollektivs

Die freien Felder in der Spalte „Sterbedatum“ bedeuten, dass der Patient noch am Leben ist. Wenn einige Daten nicht verfügbar waren, wurde ein „?“ oder „unbekannt“ in die jeweiligen Zellen hineingeschrieben.

Tumor Nr.	Diagnose-datum	Patienten-alter	Sterbe-datum	T	N	M	G	Rezi-div	Metas-tase	Todesursache Tumor?	OP	Radio-therapie	Chemo-therapie	Nikotin	Alkohol
2	01.10.1997	86	23.03.1998	4	2	0	2	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
3	01.12.1997	46	03.10.1999	4	2	1	2	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
7	03.01.1997	61	20.05.2007	3	2	0	2	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
14	16.07.1997	32	12.04.2002	4	2	0	2	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein
20	05.08.1996	67		4	0	0	3	Ja	Nein		Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
23	22.12.1997	58	06.02.1998	4	3	0	1	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja
26	22.09.1997	68	31.07.1998	4	2	0	2	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja
27	29.12.1997	79	31.03.2000	4	2	0	3	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
30	07.11.1996	44	23.12.1997	4	2	0	2	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
37	05.11.1997	84	30.06.1999	4	0	0	2	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	unbekannt	unbekannt
40	12.08.1997	42	21.07.1998	4	2	0	?	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
48	03.09.1996	58	28.02.1997	4	1	0	2	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
53	02.09.1997	71	31.12.2006	4	0	0	2	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
60	03.01.1997	63	21.01.1999	3	1	0	2	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
101	06.04.1999	46	19.03.2000	3	2	0	2	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
107	21.04.1999	55	31.12.1999	4	1	0	?	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
114	14.06.1999	58	29.02.2000	4	0	0	2	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
116	08.07.1999	51	24.02.2000	4	2	0	?	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
117	07.07.1999	41	05.07.2000	4	2	0	?	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
118	05.07.1999	58		3	1	0	2	Ja	Nein		Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
120	19.08.1999	64	14.10.2000	4	?	?	?	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein
121	07.09.1999	61	20.08.2010	4	?	?	2	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
123	22.11.1993	66	29.02.2000	4	2	0	2	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
144	13.03.2000	36		4	2	0	2	Nein	Nein		Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

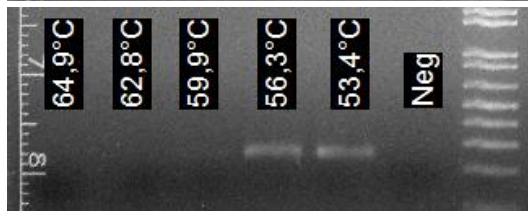
Tumor Nr.	Diagnose- datum	Patienten- alter	Sterbe- datum	T	N	M	G	Rezi- div	Metas- tase	Todesursache Tumor?	OP	Radio- therapie	Chemo- therapie	Nikotin	Alkohol
145	09.03.2000	48	30.04.2001	4	2	0	2	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
150	27.04.2000	85	27.06.2000	4	2	0	1	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
152	27.04.2000	70	31.01.2009	4	0	0	?	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
154	16.05.2000	60		3	1	0	?	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
155	03.05.2000	64		4	0	0	2	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
157	27.04.2000	52	15.01.2002	4	0	0	2	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
171	10.08.2000	73	14.06.2002	2	2	0	2	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
179	27.05.1999	82	21.07.2001	4	1	0	2	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja
180	14.11.2000	62	22.12.2001	4	1	0	2	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
181	01.12.2000	68		4	0	0	2	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
185	18.12.2000	52		4	2	?	2	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
193	24.01.2001	69	26.08.2001	3	1	?	3	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
196	03.04.2001	66	31.10.2002	4	2	0	2	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
206	11.04.2001	59	20.10.2010	2	0	0	?	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
213	15.05.2001	59		4	0	0	?	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
325	29.08.2002	38	24.01.2004	2	1	0	2	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
326	14.01.2002	75		2	0	0	3	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Nein	Ja
328	25.08.2002	59	30.09.2003	3	2	0	2	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
336	10.11.2002	41	30.09.2007	4	0	0	2	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
385	18.11.1993	61	19.10.2007	4	2	0	3	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
386	04.11.2003	60		3	0	0	2	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Nein	Ja
393	08.01.2004	55	20.08.2004	4	2	0	2	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja
401	01.03.2004	60		2	0	0	3	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
409	01.02.2004	67		3	0	0	2	Nein	Nein	unbekannt	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
457	07.02.2005	36	14.09.2006	4	0	0	2	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
458	07.03.2005	53		3	2	0	3	Nein	Nein		Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
474	12.12.2005	42	31.07.2006	4	1	0	2	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
477	24.05.2006	65		4	0	0	1	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
478	09.05.2006	52		4	0	0	2	Nein	Nein		Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
479	12.05.2006	66	18.04.2007	4	0	0	3	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja

9.2 Anlage Teil 2 - Gradienten-PCR



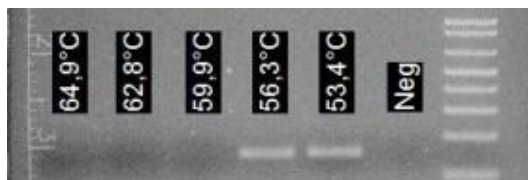
Anlage 2 Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D9S163

Das Primerpaar amplifiziert bei allen Annealingtemperaturen, ausgenommen 64,9 °C (Bandengröße: 270 kb)



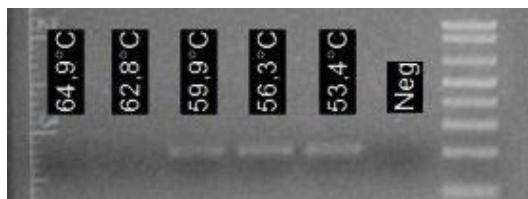
Anlage 3 Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D9S1853

Amplifikate sind hauptsächlich bei den Annealingtemperaturen 56,3 °C und 53,4 °C vorzufinden. (Bandengröße: 247-265 kb)



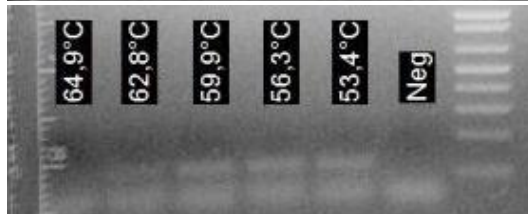
Anlage 4 Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D11S1981

Amplifikate sind bei den Annealingtemperaturen 56,3 °C und 53,4 °C vorzufinden. (Bandengröße: 134-178 kb)



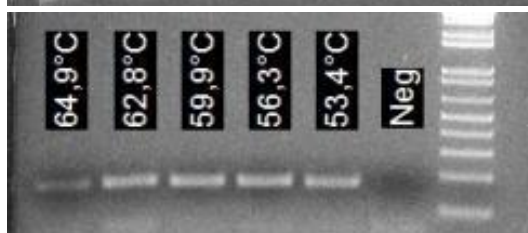
Anlage 5 Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D17S1855

Amplifikate sind bei den Annealingtemperaturen 56,3 °C, 53,4 °C und 59,9 °C vorzufinden. (Bandengröße: 219-225 kb)



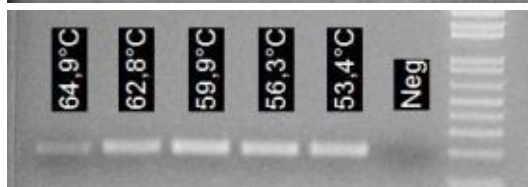
Anlage 6 Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D17S1607

schwache Amplifikate sind bei den Annealingtemperaturen 56,3 °C, 53,4 °C, 59,9 °C und 62,8 °C vorzufinden. (Bandengröße: 103-123 kb)



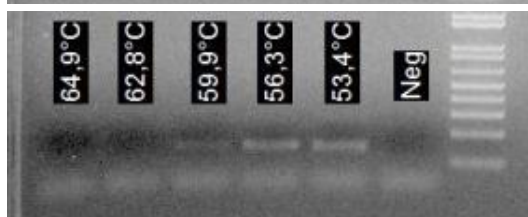
Anlage 7 Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D9S171

Das Primerpaar amplifiziert bei allen Annealingtemperaturen Template-DNA. (Bandengröße: 160-180 kb)



Anlage 8 Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D11S1392

Das Primerpaar amplifiziert bei allen Annealingtemperaturen Template-DNA. (Bandengröße: 200-220 kb)



Anlage 9 Gradienten-PCR bei dem Primerpaar D11S1359

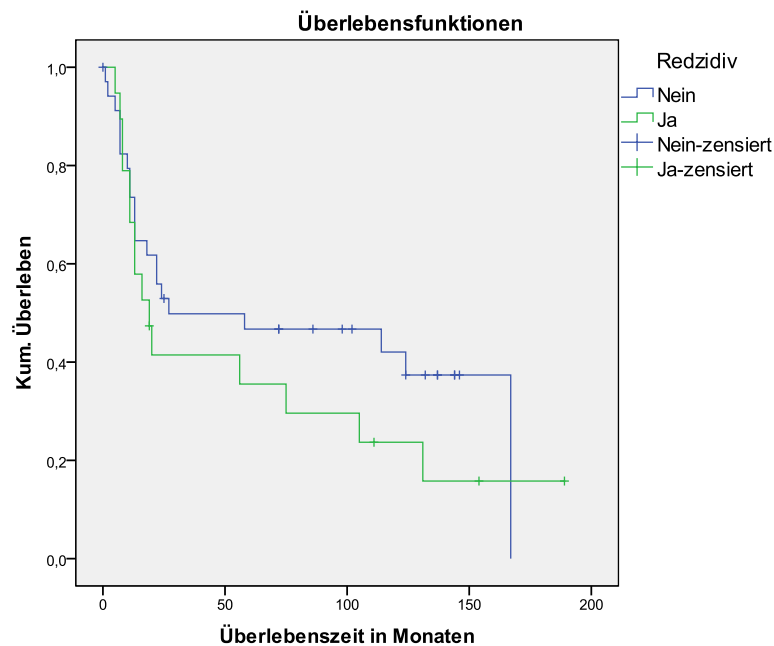
Amplifikate sind bei den Annealingtemperaturen 56,3 °C, 53,4 °C und 59,9 °C vorzufinden. (Bandengröße: 200-220 kb)

9.3 Anlage Teil 3 - statistische Datenanalyse

9.3.1 Patientendaten

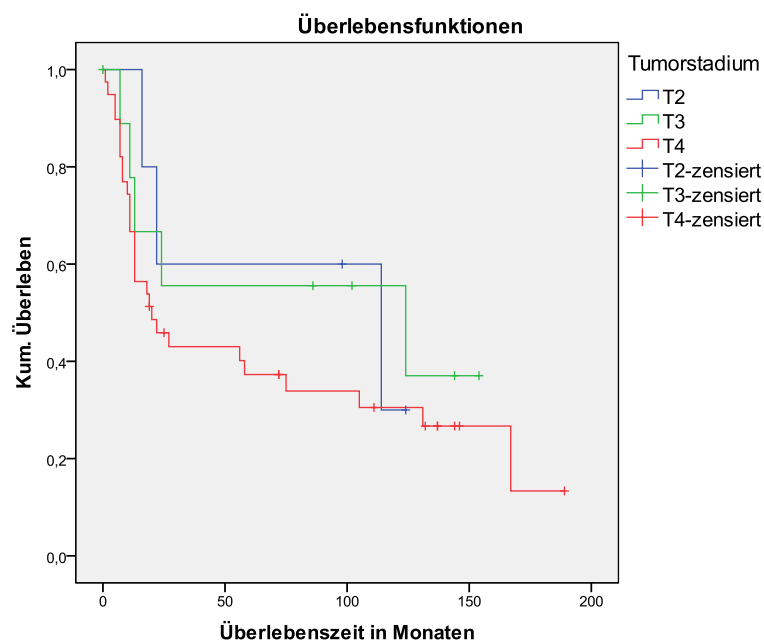
Anlage 10 Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patienten mit und ohne ein Rezidiv

Beim statistischen Vergleich der beiden Gruppen über den Log-Rank-Test wurden keine signifikante Unterschiede mit $P = 0,276$ nachgewiesen.



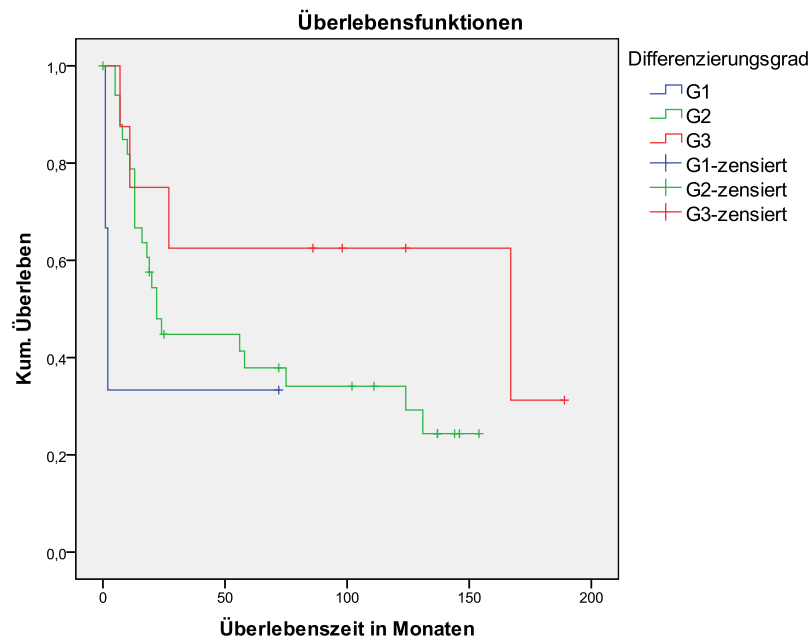
Anlage 11 Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei T2-, T3- und T4-Tumore

Beim statistischen Vergleich der beiden Gruppen über den Log-Rank-Test wurden keine signifikante Unterschiede mit $P = 0,365$ nachgewiesen. So scheinen zumindest die beiden höchsten Tumorstadien keinen großen Einfluss auf die Überlebenszeit zu haben.



Anlage 12 Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei verschiedenen Differenzierungsgraden

Beim statistischen Vergleich der Kurven über den Log-Rank-Test wurden keine signifikante Unterschiede mit $P = 0,188$ detektiert.



9.3.2 LOH-Daten auf dem Chromosom 9

Anlage 13 Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Patientenalter bei Erkrankung

Der Marker D9S1853 ist nicht signifikant mit $P = 0,346$, ebenso D9S163 mit $P = 0,414$ und D9S171 mit $P = 0,985$. Betrachtet man Fanc G, wird ein P-Wert von 0,821 erreicht, welcher auch als statistisch nicht signifikant eingestuft werden muss. Ein positiver LOH-Befund wurde durchschnittlich bei ca. 37 % festgestellt.

		D9S1853		D9S171	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Alter	< 60	14 (66,7%)	7 (33,3%)	11 (64,7%)	6 (35,3%)
	> 60	11 (52,4%)	10 (47,6%)	13 (65%)	7 (35%)

		D9S163		Fanc G	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Alter	< 60	14 (73,7%)	5 (26,3%)	15 (57,7%)	11 (42,3%)
	> 60	11 (61,1%)	7 (38,9%)	17 (60,7%)	11 (39,3%)

Anlage 14 Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Geschlecht

Alle Marker liefern eine nicht-signifikante Abhängigkeit mit einem $P = 1,0$ zwischen den Parametern Geschlecht und LOH-Status. Betrachtet man Fanc G, wird ein P-Wert von 0,192 erreicht. Das Ergebnis muss so als statistisch nicht signifikant eingestuft werden.

		D9S1853		D9S171	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Geschlecht	weiblich	7 (63,6%)	4 (36,4%)	6 (66,7%)	3 (33,3%)
	männlich	18 (58,1%)	13 (41,9%)	18 (64,3%)	10 (35,7%)

		D9S163		Fanc G	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Geschlecht	weiblich	7 (70%)	3 (30%)	11 (73,3%)	4 (26,7%)
	männlich	18 (66,7%)	9 (33,3%)	21 (53,8%)	18 (46,2%)

Anlage 15 Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Tumorstadium

Bei dem LOH-Status aller Marker auf dem Chromosom 9 ist keine statistisch signifikante Abhängigkeit mit dem Tumorstadium zu erkennen (D9S1853: $P = 0,528$; D9S171: $P = 0,893$; D9S163: $P = 0,299$). Auch bei der Betrachtung des Gens Fanc G ist statistisch kein Zusammenhang nachweisbar ($P = 0,384$).

		D9S1853		D9S171	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Tumorstadium	T2	2 (50%)	2 (50%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)
	T3	3 (42,9%)	4 (57,1%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)
	T4	20 (64,5%)	11 (35,5%)	18 (66,7%)	9 (33,3%)

		D9S163		Fanc G	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Tumorstadium	T2	3 (75%)	1 (24%)	3 (60%)	2 (40%)
	T3	3 (42,9%)	4 (57,1%)	4 (40%)	6 (60%)
	T4	19 (73,1%)	7 (26,9%)	25 (64,1%)	14 (35,9%)

Anlage 16 Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Nikotin-/Alkoholmissbrauch

Bei Betrachtung des Nikotinmissbrauchs ist keine signifikante Abhängigkeit mit allen Markern zu erkennen (D9S1853: $P = 1,0$; D9S171: $P = 1,0$; D9S163: $P = 1,0$; Fanc G: $P = 0,608$). Bei Betrachtung des Alkoholmissbrauchs sind ebenfalls keine signifikante Abhängigkeit mit allen Markern zu erkennen (D9S1853: $P = 0,896$; D9S171: $P = 0,292$; D9S163: $P = 0,716$; Fanc G: $P = 0,386$).

		D9S1853		D9S171	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Nikotin	Nein	6 (60%)	4 (40%)	5 (62,5%)	3 (37,5%)
	Ja	18 (58,1%)	13 (41,9%)	18 (64,3%)	10 (35,7%)
Alkohol	Nein	8 (57,1%)	6 (42,9%)	10 (76,9%)	3 (23,1%)
	Ja	16 (59,3%)	11 (40,7%)	13 (56,5%)	10 (43,5%)

		D9S163		Fanc G	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Nikotin	Nein	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9 (64,3%)	5 (35,7%)
	Ja	19 (67,9%)	9 (32,1%)	22 (56,4%)	17 (43,6%)
Alkohol	Nein	8 (61,5%)	5 (38,5%)	12 (66,7%)	6 (33,3%)
	Ja	17 (70,8%)	7 (29,2%)	19 (54,3%)	16 (45,7%)

Anlage 17 Kreuztabelle Chromosom 9: LOH-Status und Auftreten eines Rezidivs

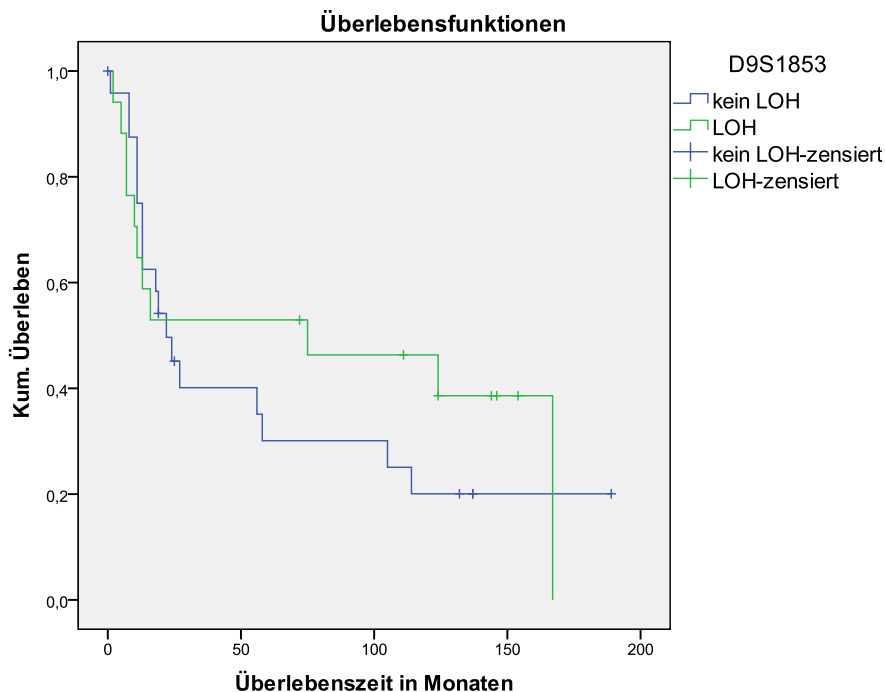
Eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem LOH-Status eines Markers bzw. Gens in Verbindung mit dem Auftreten eines Rezidivs konnte statistisch nicht nachgewiesen werden (D9S1853: $P = 0,939$; D9S171: $P = 1,0$; D9S163: $P = 1,0$; Fanc G: $P = 0,88$).

		D9S1853		D9S171	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Auftreten eines Rezidivs	Nein	15 (60%)	10 (40%)	16 (66,7%)	8 (33,3%)
	Ja	10 (58,8%)	7 (41,2%)	8 (61,5%)	5 (38,5%)

		D9S163		Fanc G	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Auftreten eines Rezidivs	Nein	16 (69,6%)	7 (30,4%)	21 (60%)	14 (40%)
	Ja	9 (64,3%)	5 (35,7%)	11 (57,9%)	8 (42,1%)

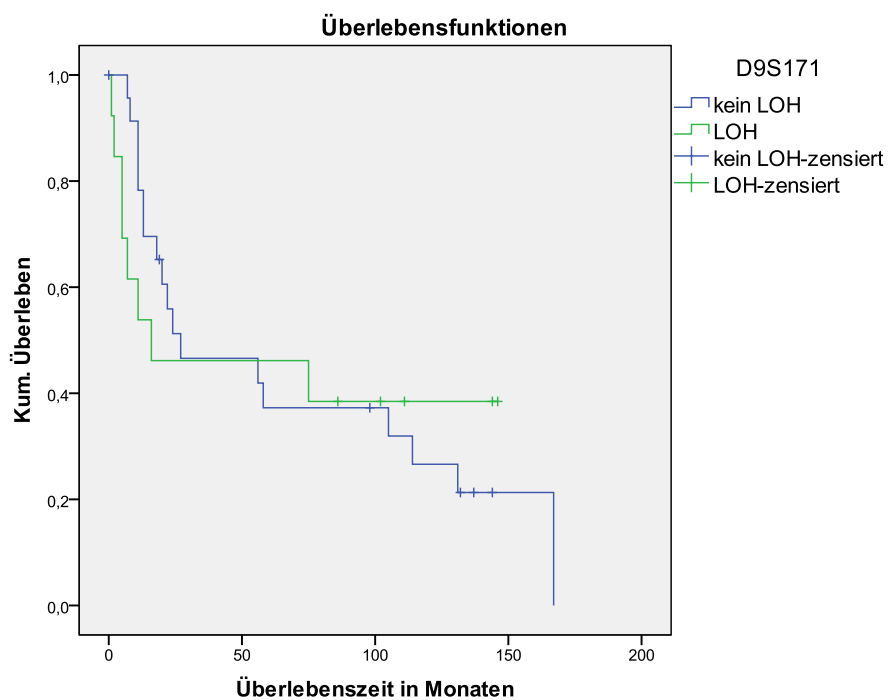
Anlage 18 Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D9S1853

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde keine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,561.



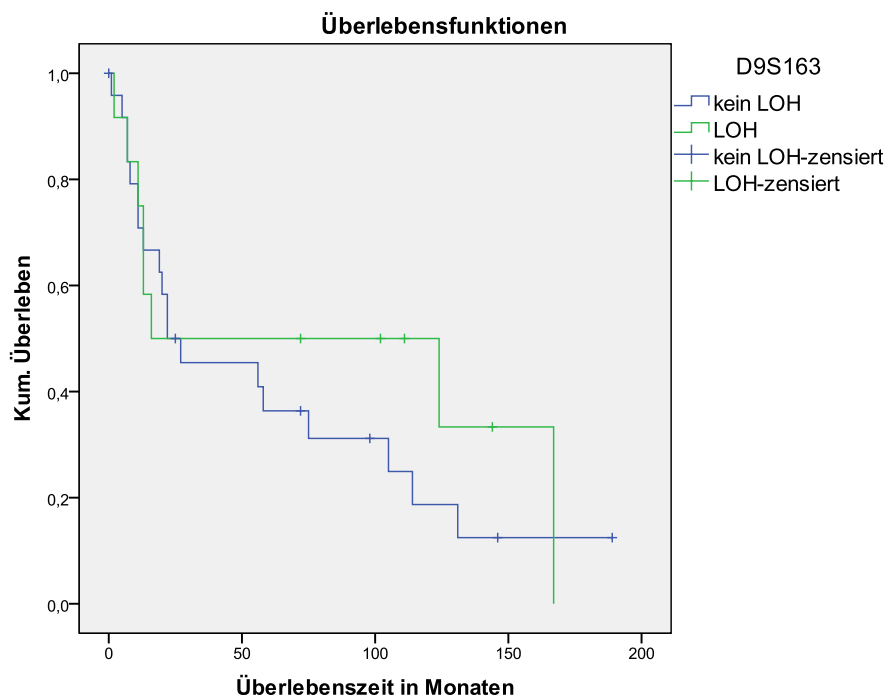
Anlage 19 Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D9S171

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde keine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,917.



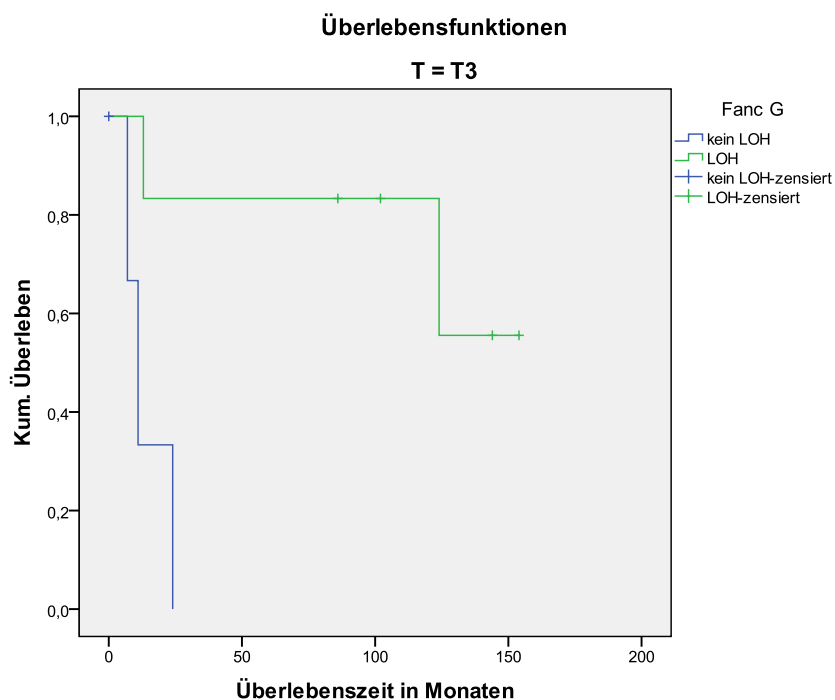
Anlage 20 Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D9S163

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde keine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,49.



Anlage 21 Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Fanc G in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten bei Patienten mit einer T3-Tumorentwicklung im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde eine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,01. Der LOH-Status hat einen Einfluss auf das Überleben.



9.3.3 LOH-Daten auf dem Chromosom 11

Anlage 22 Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Patientenalter bei Erkrankung

Alle drei Marker sowie Fanc F lieferten ein nicht-signifikantes Ergebnis (D11S1981: $P = 0,608$; D11S1359: $P = 1,0$; D11S1392: $P = 1,0$; Fanc F: $P = 0,728$).

		D11S1981		D11S1359	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Alter	< 60	22 (95,7%)	1 (4,3%)	15 (83,3%)	3 (16,7%)
	> 60	20 (87%)	3 (13%)	20 (87%)	3 (13%)

		D11S1392		Fanc F	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Alter	< 60	19 (86,4%)	3 (13,6%)	21 (80,8%)	5 (19,2%)
	> 60	18 (85,7%)	3 (14,3%)	23 (85,2%)	4 (14,8%)

Anlage 23 Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Geschlecht

Alle drei Marker sowie Fanc F lieferten ein nicht-signifikantes Ergebnis (D11S1981: $P = 0,313$; D11S1359: $P = 0,309$; D11S1392: $P = 1,0$; Fanc F: $P = 1,0$).

		D11S1981		D11S1359	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Geschlecht	weiblich	13 (100%)	0 (0%)	9 (100%)	0 (0%)
	männlich	29 (87,9%)	4 (12,1%)	26 (81,3%)	6 (18,7%)

		D11S1392		Fanc F	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Geschlecht	weiblich	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12 (85,7%)	2 (14,3%)
	männlich	27 (87,1%)	4 (12,9%)	32 (82,1%)	7 (17,9%)

Anlage 24 Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Tumorstadium

Zwischen dem LOH-Status aller Marker auf dem Chromosom 11 und dem Tumorstadium ist keine statistisch signifikante Abhängigkeit zu erkennen (D11S1981: $P = 0,350$; D11S1359: $P = 0,542$; D11S1392: $P = 0,393$). Auch bei der Betrachtung des Gens Fanc F ist statistisch kein Zusammenhang nachweisbar ($P = 0,935$).

		D11S1981		D11S1359	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Tumorstadium	T2	3 (75%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)
	T3	8 (100%)	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)
	T4	31 (91,2%)	3 (8,8%)	27 (84,4%)	5 (15,6%)

		D11S1392		Fanc F	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Tumorstadium	T2	4 (80%)	1 (20%)	4 (80%)	1 (20%)
	T3	5 (71,4%)	2 (28,6%)	8 (80%)	2 (20%)
	T4	28 (90,3%)	3 (9,7%)	32 (84,2%)	6 (15,8%)

Anlage 25 Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Nikotin-/Alkoholmissbrauch

Bei Betrachtung des Nikotinmissbrauchs sind keine signifikante Abhängigkeit mit allen Markern zu erkennen (D11S1981: $P = 1,0$; D11S1359: $P = 1,0$; D11S1392: $P = 1,0$; Fanc F: $P = 0,684$). Bei Betrachtung des Alkoholmissbrauchs sind ebenfalls keine signifikante Abhängigkeit mit allen Markern zu erkennen (D11S1981: $P = 1,0$; D11S1359: $P = 1,0$; D11S1392: $P = 0,645$; Fanc F: $P = 1,0$).

		D11S1981		D11S1359	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Nikotin	Nein	11 (91,7%)	1 (8,3%)	10 (83,3%)	2 (16,7%)
	Ja	31 (91,2%)	3 (8,8%)	25 (86,2%)	4 (13,8%)
Alkohol	Nein	14 (93,3%)	1 (6,7%)	13 (86,7%)	2 (13,3%)
	Ja	28 (90,3%)	3 (9,7%)	22 (84,6%)	4 (15,4%)

		D11S1392		Fanc F	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Nikotin	Nein	10 (90,9%)	1 (9,1%)	11 (78,6%)	3 (21,4%)
	Ja	27 (84,4%)	5 (15,6%)	33 (84,6%)	6 (15,4%)
Alkohol	Nein	13 (92,9%)	1 (7,1%)	15 (83,3%)	3 (16,7%)
	Ja	24 (82,8%)	5 (17,2%)	29 (82,9%)	6 (17,1%)

Anlage 26 Kreuztabelle Chromosom 11: LOH-Status und Auftreten eines Rezidivs

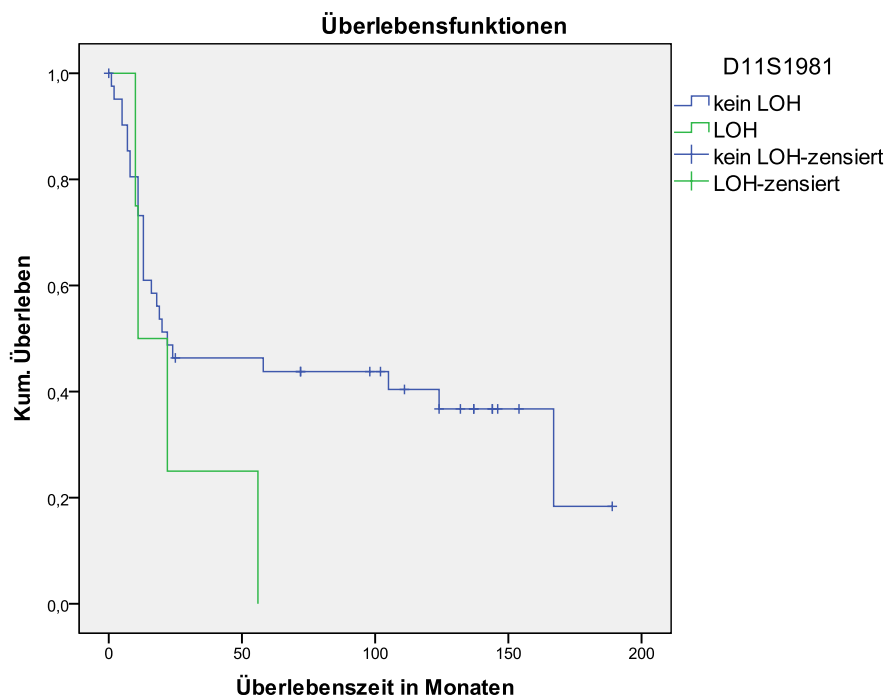
Zwischen dem LOH-Status aller Marker auf dem Chromosom 11 und dem Auftreten eines Rezidivs ist keine statistisch signifikante Abhängigkeit zu erkennen (D11S1981: $P = 0,587$; D11S1359: $P = 0,069$; D11S1392: $P = 0,645$). Auch bei der Betrachtung des Gens Fanc F ist statistisch kein Zusammenhang nachweisbar ($P = 0,469$).

		D11S19381		D11S1359	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Auftreten eines Rezidivs	Nein	29 (93,5%)	2 (6,5%)	26 (92,9%)	2 (7,1%)
	Ja	13 (86,7%)	2 (13,3%)	9 (69,2%)	4 (30,8%)

		D11S1392		Fanc F	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Auftreten eines Rezidivs	Nein	24 (82,8%)	5 (17,2%)	30 (85,7%)	5 (14,3%)
	Ja	13 (92,9%)	1 (7,1%)	14 (77,8%)	4 (22,2%)

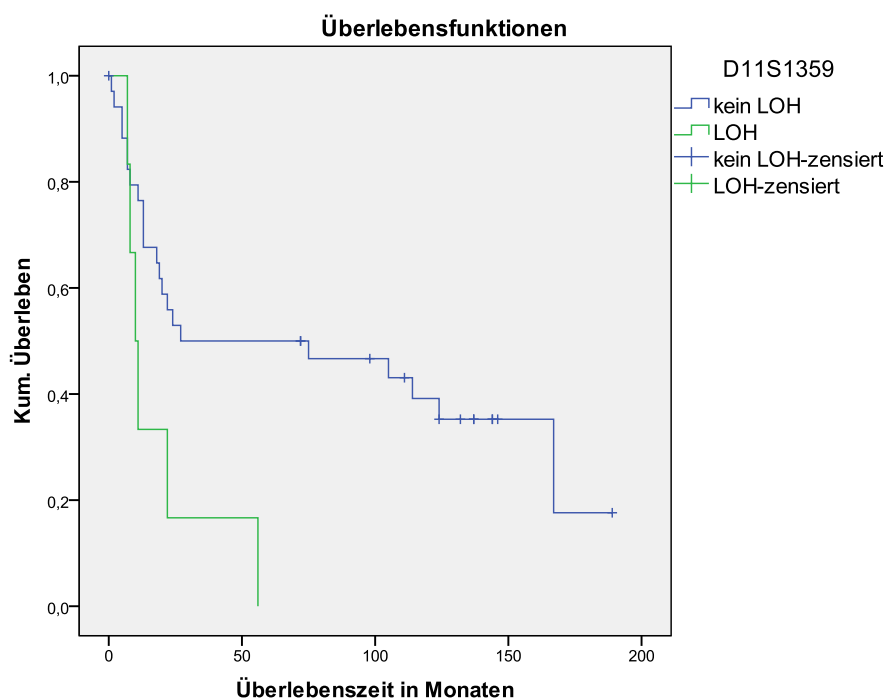
Anlage 27 Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D11S1981

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde keine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,164.



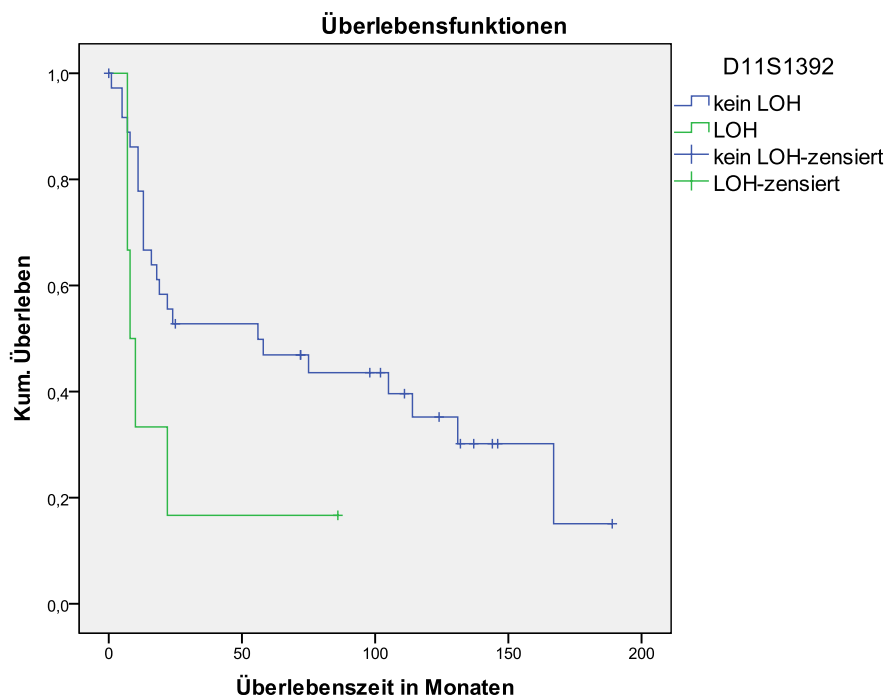
Anlage 28 Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D11S1359

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde eine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,019.



Anlage 29 Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D11S1392

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde keine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,054.



9.3.4 LOH-Daten auf dem Chromosom 17

Anlage 30 Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Patientenalter bei Erkrankung

Alle Marker sowie Fanc J lieferten ein nicht-signifikantes Ergebnis (D17S1855: $P = 0,099$; D17S1607: $P = 0,242$; Fanc J: $P = 1,0$).

		D17S1855		D17S1607	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Alter	< 60	17 (85%)	3 (15%)	20 (100%)	0 (0%)
	> 60	22 (100%)	0 (0%)	22 (88%)	3 (12%)

		Fanc J	
		Kein LOH	LOH
Alter	< 60	23 (88,5%)	3 (11,5%)
	> 60	25 (89,3%)	3 (10,7%)

Anlage 31 Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Geschlecht

Alle Marker sowie Fanc J lieferten ein nicht-signifikantes Ergebnis (D17S1855, D17S1607, Fanc J: $P = 1,0$)

		D17S1855		D17S1607	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Geschlecht	Weiblich	11 (91,7%)	1 (8,3%)	12 (92,3%)	1 (7,7%)
	Männlich	28 (93,3%)	2 (6,7%)	30 (93,8%)	2 (6,3%)

		Fanc J	
		Kein LOH	LOH
Geschlecht	Weiblich	13 (86,7%)	2 (13,3%)
	Männlich	35 (89,7%)	4 (10,3%)

Anlage 32 Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Tumorstadium

Zwischen dem LOH-Status aller Marker auf dem Chromosom 17 und dem Tumorstadium ist keine statistisch signifikante Abhängigkeit zu erkennen (D17S1855: $P = 0,564$; D17S1607: $P = 0,765$; Fanc J: $P = 0,686$).

		D17S1855		D17S1607	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Tumorstadium	T2	4 (100%)	0 (0%)	5 (100%)	0 (100%)
	T3	7 (100%)	0 (0%)	9 (90%)	1 (10%)
	T4	28 (90,3%)	3 (9,7%)	28 (93,3%)	2 (6,7%)

		Fanc J	
		Kein LOH	LOH
Tumorstadium	T2	5 (100%)	0 (0%)
	T3	9 (90%)	1 (10%)
	T4	34 (87,2%)	5 (12,8%)

Anlage 33 Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Nikotin-/Alkoholmissbrauch

Bei Betrachtung des Nikotinmissbrauchs sind keine signifikante Abhängigkeit mit allen Markern zu erkennen (D17S1855: $P = 0,170$; D17S1607: $P = 1,0$; Fanc J: $P = 0,323$).

Bei Betrachtung des Alkoholmissbrauchs sind in D17S1607 mit $P = 1,0$ und Fanc J mit $0,164$ keine signifikante Abhängigkeiten zu erkennen. Der Marker D17S1855 gibt einen signifikanten Zusammenhang mit einem P -Wert von $0,027$ an.

		D17S1855		D17S1607	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Nikotin	Nein	9 (81,8%)	2 (18,2%)	11 (91,7%)	1 (8,3%)
	Ja	29 (96,7%)	1 (3,3%)	30 (93,8%)	2 (6,3%)
Alkohol	Nein	10 (76,9%)	3 (23,1%)	14 (93,3%)	1 (6,7%)
	Ja	28 (100%)	0 (0%)	27 (93,1%)	2 (6,9%)

		Fanc J	
		Kein LOH	LOH
Nikotin	Nein	11 (78,6%)	3 (21,4%)
	Ja	36 (92,3%)	3 (7,7%)
Alkohol	Nein	14 (77,8%)	4 (22,2%)
	Ja	33 (94,3%)	2 (5,7)

Anlage 34 Kreuztabelle Chromosom 17: LOH-Status und Auftreten eines Rezidivs

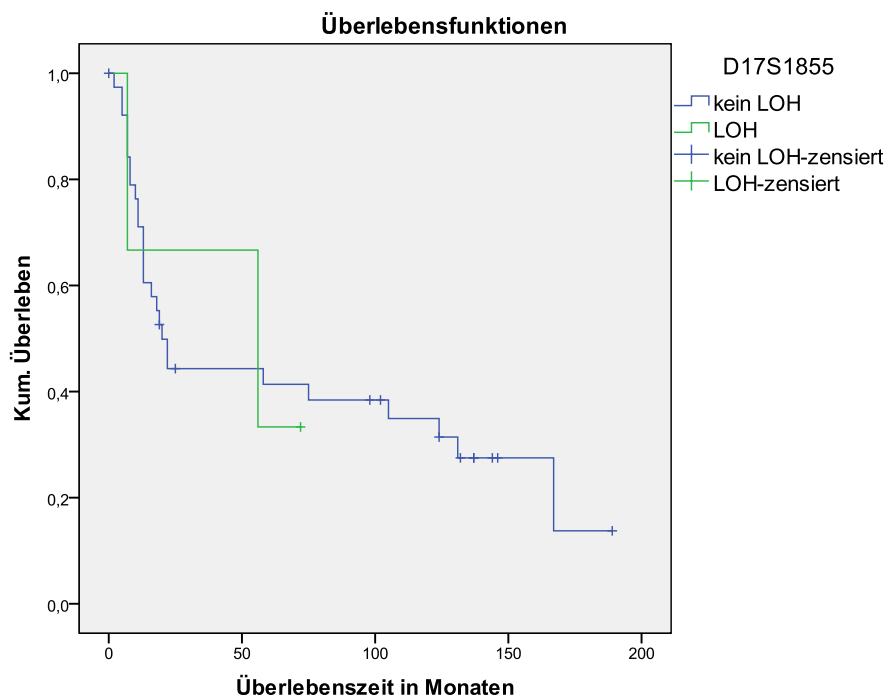
Zwischen dem LOH-Status aller Marker auf dem Chromosom 17 und dem Auftreten eines Rezidivs ist keine statistisch signifikante Abhängigkeit zu erkennen (D17S1855: $P = 0,547$; D17S1607: $P = 0,546$; Fanc J: $P = 1,0$).

		D17S1855		D17S1607	
		Kein LOH	LOH	Kein LOH	LOH
Auftreten eines Rezidivs	Nein	25 (96,2%)	1 (3,8%)	29 (90,6%)	3 (9,4%)
	Ja	14 (87,5%)	2 (12,5%)	13 (100%)	0 (0%)

		Fanc J	
		Kein LOH	LOH
Auftreten eines Rezidivs	Nein	31 (88,6%)	4 (11,4%)
	Ja	17 (89,5%)	2 (10,5%)

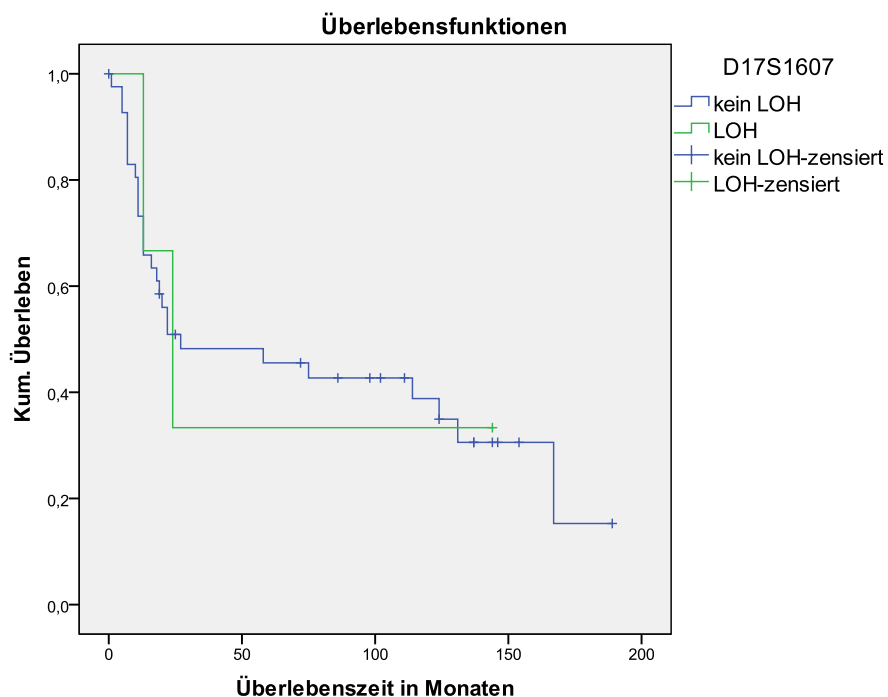
Anlage 35 Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D17S1855

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde keine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,906.



Anlage 36 Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den Marker D11S1392

Dargestellt ist die Überlebenszeit in Monaten im Vergleich zur Anzahl der noch lebenden Patienten unter Berücksichtigung zensierter Fälle. Über den Log-Rank-Test wurde keine signifikante Unterscheidbarkeit der Kurven berechnet. Der P-Wert betrug 0,889.



9.3.5 Werte der LOH-Berechnung

Anlage 37 Errechnete Werte bei der Elektropherogrammauswertung

Es konnten nur Patienten mit einem informativen Status ausgewertet werden. Die hellgrauen Felder geben einen nicht-informativen Status an; Die dunkelgrauen Felder kennzeichnen ein LOH (Wert > 1,5).

Nr.	Fanc G			Fanc F			Fanc J	
	D9S171	D9S1853	D9S163	D11S1981	D11S1359	D11S1392	D17S1607	D17S1855
2	3,26	3,29		1,06	1,03	1,03	1,26	1,21
3		1,04	1,01	1,03	1,01	1,01	1,01	1,04
7	7,81		8,72	1,01	1,06		1,00	1,09
14	1,04	1,04	1,04	1,56	1,66	1,26	3,46	
20	1,09		1,01	1,01	1,07	1,00	1,03	1,01
23	1,34	1,95	1,16	1,27	1,04	1,22		1,39
26	2,34			1,98	2,08	2,10	1,27	1,45
27	1,01	1,01	1,04		1,32			1,04
30	1,00		1,03	1,01	1,08	1,03	1,02	1,03
37	1,03	1,03					1,01	1,02
40	1,01	1,26	1,03	1,16		1,4		1,17
48		2,32	1,02	1,03	1,04	1,00	1,00	1,03
53	2,32	2,00	1,87	1,03	1,16	1,01		1,42
60	1,24	1,09		1,19	1,05	1,03		2,13
101	1,13	1,12	1,16	1,05	1,14	1,07	1,02	1,07
107	1,09	1,04	1,12	1,30	2,01	1,98	1,08	
114	1,06			1,10	1,05	1,02	1,08	
116	3,22		2,34		1,75		1,51	1,32
117	1,10	1,08		1,15		1,07		1,47
118	5,03			1,01				1,14
120	1,48	1,40		1,00	1,05	1,01	1,22	1,27
121		1,37	1,42			1,01	1,04	1,31
123	3,85	2,36	1,01		1,21	1,04	1,00	1,19
144	2,63	2,79	1,01	1,04	1,09	1,01	1,01	1,08
145	1,02		1,98	1,02		1,08	1,01	
150	6,82	5,76	6,30	1,05	1,02	MSI	1,04	
152	1,00	1,01	1,02	1,02	1,38	1,04	1,00	
154	1,70	1,64	1,70	1,12	1,06	1,11	1,00	1,37
155		1,46		1,00	1,01			1,63
157		1,03	1,11	1,01	1,03		1,02	1,03
171	1,07		1,05	1,66	1,74	2,28	1,09	1,03
179	1,15		1,13	1,01		1,04	1,04	1,15
180		1,05		1,03	1,27	1,02		1,60

Nr.	Fanc G			Fanc F			Fanc J	
	D9S171	D9S1853	D9S163	D11S1981	D11S1359	D11S1392	D17S1607	D17S1855
181	1,04			1,04	1,01		1,01	1,01
185	1,03	1,04		1,00	1,42	1,01	1,01	1,00
193		1,32	1,20			1,81	1,23	1,17
196	1,17	1,20		1,05	1,01	1,08	1,00	1,06
206	1,21	1,45	1,39		1,00	1,11		1,03
213	1,03	1,02		1,22	1,28	1,18	1,07	
325	1,66	1,79	1,72	1,03		1,02	1,00	1,14
326	1,83			1,16	1,18	1,20	1,16	1,07
328	3,24		2,10	1,19			1,13	1,04
336	1,00	1,03	1,00	1,02		1,05	1,02	1,03
385	2,29	1,05	2,59	1,08	1,12	1,00	1,02	1,03
386		7,32	2,29	1,06		1,01	1,01	1,31
393			1,18	1,26	1,01	8,03	1,19	1,01
401		1,19	1,09	1,05	1,08	1,03	1,04	1,10
409	1,09	1,05	1,04	1,05	1,04	1,01	1,02	1,00
457	1,18		1,17	1,03	1,03	1,03	1,02	1,14
458		1,85				1,95		1,01
474	1,65	1,54		1,01	1,00	1,01	1,24	1,37
477			1,01	1,01	1,21	1,00		1,01
478	2,72		1,60	1,01	1,02	1,01	1,94	
479	2,94	2,97	2,18	3,18	3,59		1,04	MSI
Σ i.	42/54 77,78 %	37/54 68,52 %	37/54 68,52 %	46/54 85,19 %	41/54 75,93 %	44/54 81,48 %	42/54 77,78 %	46/54 85,19 %
Σ LOH	17/42 40,48 %	13/37 35,14 %	12/37 32,43 %	4/46 8,69 %	6/41 14,63 %	6/44 13,64 %	3/42 7,14 %	3/46 6,52 %

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 30.08.2012

Ort, Datum

Unterschrift